HAL
open science

Relations gène-environnement des déterminants du métabolisme des monocarbones et associations avec la pathologie en Afrique de l'Ouest

Nicodème Chabi

To cite this version:

Nicodème Chabi. Relations gène-environnement des déterminants du métabolisme des monocarbones et associations avec la pathologie en Afrique de l'Ouest. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10023 . tel-01748504

HAL Id: tel-01748504

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748504v1

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Université Henri Poincaré, Nancy-I
Faculté de médecine

N° attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Thèse pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY-I

Ecole doctorale : BIOLOGIE – SANTE – ENVIRONNEMENT
Spécialité : BIOLOGIE CELLULAIRE ET NUTRITION

Par

Nicodème W. CHABI

Relations gène-environnement des déterminants du métabolisme des monocarbones et associations avec la pathologie en Afrique de l'Ouest

Soutenue publiquement le 27 Mars 2009

Directeur de thèse : **Professeur Jean-Louis Guéant**, Unité Inserm 724/954, Université Henri Poincaré
Co-Directeur : Dr. Rosa-Maria Rodriguez-Guéant MCU-PH, U 724/954**,** Université Henri Poincaré

Jury

Rapporteurs
Professeur Claude Forest, Directeur de Recherche Inserm, Université de Paris 5
Professeur Pr. Jean-Paul Cristol, PU-PH, Université de Montpellier

Examinateurs
Professeur Ambaliou Sanni, Professeur de biochimie et de biologie moléculaire, Université d'Abomey-Calavi
Sophie Visvikis-Siest, Directeur de Recherche Inserm, Université Henri Poincaré

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement Monsieur le Professeur Jean-Louis Guéant, mon directeur de thèse, directeur de l'unité Inserm U724/954 et chef de service du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire du CHU, pour m'avoir accueilli dans son équipe depuis quelques années. Par sa disponibilité, sa gentillesse et le degré d'humanisme dont il fait preuve, il s'est impliqué avec enthousiasme et esprit de responsabilité à tous les niveaux de conception des travaux de recherche qui ont abouti à la rédaction de cette thèse. Aussi, m'a-t-il pris pour un jeune frère en m'ouvrant gracieusement les portes de sa maison et celle de ses parents. Viens trouver ici, Jean-Louis, l'expression de ma profonde gratitude et de l'estime que je porte pour toi.

Je remercie chaleureusement Madame le Docteur Rosa-Maria Guéant-Rodriguez pour sa disponibilité, sa gentillesse malgré ses multiples tâches pour m'avoir accompagné tout au long de ces travaux dans la conduite et l'analyse des données. Elle s'est impliquée dans la validation des résultats et des techniques. Qu'elle trouve ici, l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur Ambaliou Sanni, chef de département de biochimie et de biologie cellulaire de l'Université d'Abomey-Calavi, directeur du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, pour m'avoir fait confiance durant des années et pour avoir initié cette collaboration entre Cotonou et Nancy. Sans sa disponibilité, sa gentillesse et l'enthousiasme dont il fait preuve, jamais je n'aurais pu m'épanouir dans ces recherches. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de l'estime que je lui porte.

Je remercie chaleureusement le Professeur Bernard Ehressmann de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg pour la lettre de recommandation qu'il m'a faite au moment de faire valider mes acquis professionnels en vue de mon inscription en thèse. Cette recommandation a permis à la commission de donner un avis favorable à ma requête. Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude.

Je ne peux m'empêcher de remercier tout particulièrement le Professeur Jacques-Henry Weil de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg. Il est la personne de l'ombre qui a permis de me lancer dans cette aventure. Qu'il trouve ici l'aboutissement heureux de la confiance qu'il porte à l'équipe de biochimie de Cotonou.

Tous mes remerciements vont au service de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France au Bénin qui par son soutien financier m'a permis de m'inscrire en thèse et pouvoir réaliser mes travaux de recherche.

Un grand merci au Professeur Emile K. Amouzou de l'Université de Lomé au Togo. Tes occupations administratives ne t'ont pas permis d'être membre de ce jury.

Pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce mémoire, je tiens à remercier Messieurs les Professeurs Claude Forest et Jean-Paul Cristol. Je vous remercie pour tous les conseils forts utiles que vous m'avez prodigués pour la clarté du document final. Que vous ayez accepté de siéger dans le jury de cette thèse est pour moi un honneur. Trouvez ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie sincèrement Madame le Docteur Sophie Visvikis-Siest, Directeur de Recherche Inserm, Université Henri Poincaré, d'avoir accepté d'être membre de ce jury malgré ses multiples occupations. Ce geste est un honneur pour moi. Je vous exprime ma reconnaissance et ma gratitude.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Docteur Bernard Herbeth pour sa disponibilité à faire l'analyse statistique des données sur la partie obésité et syndrome métabolique, malgré ses multiples occupations, en un temps record. Je le remercie tout particulièrement pour m'avoir fait découvrir l'esprit de décorticage des résultats statistiques. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Professeur Farès Namour pour l'intérêt qu'il porte à ces travaux qui aujourd'hui nous conduisent à la rédaction de ce mémoire. Je lui exprime ma reconnaissance pour les conseils qui ne cesse de me prodiguer.

Je souhaite exprimer ma gratitude et mon amitié à Jean-Pierre Huet, cadre de santé au laboratoire de biochimie du CHU, pour sa disponibilité, sa gentillesse et sa générosité. Que de fois il m'invite à domicile lors des festivités organisées à Liverdun, la commune dont il a la charge. Encore une fois, merci.

Mes remerciements vont également à Renée Debard et à toute sa famille qui me font l'honneur de m'accueillir dans leurs maisons toutes les fois et de m'intégrer à la famille. Recevez ici toute mon amitié.

J'adresse un grand merci à Madame Mazetti qui, malgré ses multiples occupations, a tout laissé pour remettre en forme le plan de rédaction de ce travail. Je n'oublie pas non plus Mme Bernadette Valot. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je souhaite exprimer mon amitié à José Antonio Cornejo Garcia, post-doctorant, qui m'a aidé dans toutes les étapes de rédaction de ce travail. Que l'aboutissement de ce travail soit le début d'une collaboration scientifique et professionnelle.

Je tiens à remercier le personnel du laboratoire de biochimie du CHU, et en particulier Sylvie Thirion, Marie-Bénédicte Nicolas, Françoise Dubois, Evelyne Este, Elise Jeannesson, Marie José Ferry, Maryline Schwartz, Pierre Mairose, Sabine Metzger, Nadine Mallégol, Chantal Grobelny, Claudine Hainaut et Ilham Mansouri pour s'être impliqués dans ce travail.

J'adresse un remerciement tout particulier à tout le personnel du secteur des analyses d'urgence, et d'une façon très spéciale à Mme Patricia Sobalak.

Toute ma gratitude et ma reconnaissance vont au personnel du laboratoire de la biologie moléculaire du CHU. Je ne cesserai de dire merci et bravo pour vous car je suis resté au milieu de vous en toute sécurité pour l'aboutissement de ce travail qui fait toute notre fierté. Les mots me manquent pour vous exprimer toutes mes amitiés. Vous êtes tous formidables par vos conseils, votre bonne humeur. Renée Debard, Denise Forest-Tramoy, Corrine Payet, Pascal Perrin et Thomas Josse, vous êtes pour moi des frères. Recevez ici l'expression de ma sincère amitié.

Je viens exprimer ici toute ma reconnaissance au personnel de l'équipe Inserm U724/954 en particulier Jean-Luc Daval, Directeur de recherche Inserm et directeur-adjoint de l'unité U724/954, Céline Chery (chef d'orchestre du laboratoire de biochimie de l'unité Inserm), Jean Marc Alberto, Catherine Tavera et Dominique Guillaume (secrétaire de l'unité Inserm pour ses sollicitations administratives). Un remerciement tout particulier à Philippe Gérard qui a en charge la manipulation de toutes les séries de prélèvements en folates, B12 et insuline.

A toi Patrice Avogbé, je souhaite que tu trouves en ces mots tout le témoignage de l'attachement que je te porte pour faire régner notre laboratoire de biochimie de Cotonou. Je te remercie pour les précieux moments que tu as consacrés pour m'aider dans la rédaction et la soutenance de ce mémoire. Je te souhaite bon courage pour l'aboutissement heureux de tes travaux de recherche.

Je remercie sincèrement le Docteur Stéphanie Dovi Acouetey pour les rangements et les compilations des tableurs Excel de mes données. Bon courage à toi.

Je remercie tous les amis doctorants dont les conseils m'ont permis d'avancer dans la réalisation de ce mémoire. Min, Ma'atem, Maira, Nassila, Nicolas, Lydie et Sonia. Trouvez ici, l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie tous les frères béninois de Nancy qui m'accueillent toutes les fois que je suis ici. Je remercie tout particulièrement Joël Tossou et sa famille.

Mes remerciements vont également au groupe paroissial des étudiants de Nancy et à ses accompagnateurs, les couples Michel (Françoise et Henri) et Cantus (Marie Odile et Bernard) pour leur soutien spirituel et les moments de partage.

Mes remerciements chaleureux vont au personnel du Département de biochimie et de biologie cellulaire de l'Université d'Abomey-Calavi. Je vous remercie pour votre confiance en moi et pour vos multiples conseils et la prise en charge de ma famille de Cotonou lors de mes multiples séjours à Nancy. Trouvez ici, l'expression de mon profond attachement pour le rayonnement de notre Université.

Je remercie tout particulièrement Richard Ediko Akanni et sa famille pour leur bienveillance et tout leur soutien à ma famille.

Je remercie infiniment le Docteur yessoufou Tchabi du service de cardiologie du centre Hospitalier et Universitaire de Cotonou pour la conception du protocole de recrutement sur le marché Dantokpa en collaboration avec le Docteur Yasmine Eyissè qui a pris une part active dans le recrutement pour la rédaction de sa thèse en médecine. Je leur adresse ma reconnaissance.

Je viens manifester toute ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'entourent, à tous mes parents pour leur soutien moral malgré les kilomètres qui nous séparent… encore merci.

Je ne peux m'empêcher d'avoir une pensée toute spéciale pour la mémoire d'un de mes chers, le Professeur Ibrahim Kora qui m'a fait intégrer au Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire. Cher aîné, dors en paix.

Je salue ici la mémoire de mon père Julien et de ma mère Odette qui m'ont quitté au moment où j'ai grand besoin d'eux. Reposez-vous en paix.

Enfin je dédie ce travail à mon épouse Yvonne et à mes deux prunelles Elodie et Lionel Arthur. Avec votre compréhension, vos sacrifices et surtout votre patience, ce mémoire vient à point nommé combler vos attentes en moi.

AVANT-PROPOS

Il existe depuis plus d'une dizaine d'années une collaboration étroite entre l'Unité Inserm 724/954, le laboratoire de biochimie de l'Université du Bénin (Lomé, Togo) et le laboratoire de biochimie de l'Université d'Abomey-Calavi (Cotonou, Bénin), dans lequel j'exerce les fonctions d'attaché de recherche. Cette collaboration a porté sur des études de populations pour évaluer l'influence des déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones, d'une part dans des groupes de sujets présumés sains étudiés en fonction de leur environnement et d'autre part dans trois groupes de pathologies, infectieuses et métaboliques. Les choix de ces pathologies ont été conditionnés par les problèmes actuels de santé publique de l'Afrique de l'Ouest. Les carences en micronutriments sont le principal problème de santé publique concernant le statut nutritionnel des populations de l'Afrique sub-saharienne. Elles posent un problème de santé de première priorité pour ce qui concerne les carences en fer, en iode et en vitamine A, mais l'OMS a également clairement identifié les folates et la vitamine B12 comme micronutriments devant faire l'objet d'études épidémiologiques plus approfondies. Ces deux vitamines sont les principaux déterminants du métabolisme de l'homocystéine, ce qui nous a amené à évaluer leur statut et l'influence sur l'homocystéinémie, en fonction des interactions nutrigénétiques avec les polymorphismes des gènes impliqués dans leur absorption et dans les enzymes cibles de leur métabolisme cellulaire. Notre choix concernant les pathologies a également été conditionné par une approche de santé publique. En effet, le paludisme et l'hépatite virale B sont les deux principaux fléaux de l'Afrique pour ce qui concerne l'infectiologie, même si le SIDA occupe de plus en plus une part préoccupante. La gravité du paludisme conditionne les risques dans les périodes périnatales et de la prime enfance. Parmi les principaux critères de gravité ont été clairement identifiés le statut en micronutriments et l'anémie, les deux étant associés d'un point de vue mécanistique. C'est sur ces évidences que nous avons choisi d'étudier les déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones avec la gravité du

paludisme (malaria). La même association a été évaluée avec l'hépatite B pour laquelle il existe beaucoup moins d'études épidémiologiques évaluant l'impact du statut nutritionnel, en dehors d'études de toxicologie alimentaire en lien avec les mycotoxines. Enfin, le syndrome métabolique est un phénomène émergent préoccupant en Afrique de l'Ouest depuis une décennie. L'obésité est particulièrement prévalente chez les femmes. Par ailleurs, dans la mesure où l'homocystéine est un facteur de risque vasculaire nous l'avons considéré, ainsi que ses déterminants en fonction de l'association avec les autres risques vasculaires métaboliques, au premier rang desquels figurent les marqueurs du métabolisme lipidique.

En tant qu'attaché de recherche, j'ai été initialement impliqué dans les phases opérationnelles, recrutement, gestion des biothèques, analyses biochimiques et génétiques. La préparation de cette thèse a été l'occasion pour moi d'approfondir mes connaissances en métabolisme, en génétique fonctionnelle, mais aussi dans l'analyse avec les outils statistiques, à la fois dans mon laboratoire d'affectation principale, mais aussi au cours des stages annuels que j'ai réalisés au sein de l'Unité 724/954, grâce au soutien récurrent de l'Ambassade de France au Bénin et du gouvernement béninois.

LISTE DES PUBLICATIONS

1. Adjalla CE, Amouzou EK, Sanni A, Abdelmouttaleb I, **Chabi NW,** Namour F, Guéant JL. *Low frequency of Mutated Methylenetetrahydrofolate Reductase 677 C→T and 1298 A →C genetics Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs*) *in Sub-Saharan populations*. Clin Chem Lab Med 2003;41; 1028-32.

2. Amouzou EK*, **Chabi NW***, Adjalla CE, Rodriguez-Guéant RM, Feillet F, Sanni A, Guéant JL. (*contribution égale*) High prevalence of hyperhomocyteinemia related to folate deficiency and the 677 C→T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase* in coastal West Africa. Am J Clin Nutr 2004; 79: 619-24.

3. Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Debard R, Thirion S, Xiao Hong L, Bronowicki JP, Namour F, **Chabi NW**, Sanni A, Anello G, Bosco P, Romano C, Amouzou E, Heidy R. Arrieta B, Sánchez BE, Romano A, Herbeth B, Guilland JC, Mutchinick OM**.** *Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study among Mexican, West African and West European populations* Am J Clin Nutr 2006, 83, 701- 707.

4. Guéant JL*, **Chabi NW*,** Guéant-Rodriguez RM, Mutchinic OM, Debard R, Payet C, Lu X, Villaume C, Bronowicki JP, Quadros E, Sanni A, Amouzou E, Xia B, Chen M, Anello G, Bosco P, Romano C, Arrieta HR, Sànchez BE, Romano A, Herbeth B, Namour F. (*contribution égale*)* Environemental influence of the worldwide prevalence of a 776 C>G variant in the transcobalamine gene (*TCN2*) J Med Genet, 2007; 44:363-67.

5. Bronowicki JP, Abdelmouthaleb I, Peyrin-Birroullet L, Venard V, Khir H, **Chabi NW**, Amouzou EK, Halfon P, Sanni A, Bigard MA, le Faou A, Guéant JL. *Methylenetetrahydrofolate reductase 667allele* protects against persistent HBV infection in West Africa J Hepatol, 2008; 48:532-39.

Sommaire

Introduction bibliographique **22**

1. L'homocystéine 23

1.1. La voie de reméthylation 23

1.2. La voie de transsulfuration 24

1.3. L'homocystéine circulante 25

1.3.1. Les différentes formes d'homocystéine circulantes 25

2. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie 27

2.1. Les déterminants environnementaux 28

2.2. Facteurs nutritionnels 28

2.2.1. Les folates ou vitamine B9 28

2.2.2. La vitamine B12 31

2.2.3. La vitamine B6 32

2.3. Facteurs génétiques 33

2.3.1. Les polymorphismes du gène *MTHFR C677T, A1298C, T1317C* 34

2.3.2. Le polymorphisme *MTR A2756G* 35

2.3.3. Le polymorphisme *MTRR A66G* 36

2.3.4. Le polymorphisme *TCN C776G* 36

3. Inflammation 37

3.1. TNF alpha et homocystéine 38

3.2. TNF alpha et S-adénosylméthionine 39

3.3. TNF alpha et NF-Kb 39

3.4. TNF alpha et Cystathionine β-synthase (CBS) 40

4. Les pathologies prévalentes en Afrique au sud du sahara 41

4.1. Le paludisme 42

4.1.1. Répartition géographique et émergence 43

4.1.2. Relation hôte-vecteur 45

4.1.3. Clinique 47

4.1.4. Diagnostic 49

4.1.5. Traitement 49

4.1.6. Paludisme et folates 50

4.1.7. SAHH et paludisme 51
4.1.8. MTHFR et paludisme 52
4.1.9. Stress oxydatif 54
4.1.10. TNF-α et paludisme 55
4.1.11. Dérivés de la vitamine B12 et paludisme 57
4.2. L'obésité et le syndrome 60
4.2.1. Définition du syndrome métabolique 61
4.2.2. Nouvelle définition « mondiale » du syndrome métabolique 63
4.2.3. Obésité 64
4.2.4. Classification et épidémiologie de l'obésité 65
4.2.5. Physiologie de l'obésité 68
4.2.6. Complications de l'obésité 70
4.2.7. Approche sociologique de l'obésité 70
4.2.8. Les lipides 73
4.2.8.1. Les lipides plasmatiques 74
4.2.8.2. Le cholestérol 74
4.2.8.2.1. Structure et synthèse du cholestérol 75
4.2.8.2.2. Rôle du cholestérol 77
4.2.8.3. Les triglycérides et les acides gras 77
4.2.8.4. Les lipoprotéines et les apolipoprotéines 77
4.2.8.4.1. Les lipoprotéines 78
4.2.8.4.2. Les apolipoprotéines 81
4.2.8.5. Rôle des adipocytes dans le syndrome métabolique 84
4.2.8.5.1. La leptine 85
4.2.8.5.2. L'adiponectine 87
4.2.8.5.3. La résistine 88
4.2.8.5.4. L'angiotensinogène et l'angiotensine II 89
4.2.8.5.5. L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) et le TNF-α 90
4.2.8.6. L'insuline 91
4.2.8.6.1. Rôle de l'insuline sur le métabolisme des lipoprotéines 91
4.2.8.6.2. L'insulinorésistance 93
4.2.8.7. Relation CRP et syndrome métabolique 97
4.2.8.8. Traitement du syndrome métabolique 98

4.2.8.8.1. Mesures hygiéno-diététiques 99
4.2.8.8.2. Activité physique 99
4.2.8.8.3. Diététique 100
4.2.8.8.4. Traitement de l'obésité 100
4.2.8.8.5. Traitement des dyslipidémies 101
4.2.8.8.6. Traitement de l'hypertension artérielle 102
4.3. Le syndrome métabolique et l'homocystéine 103
Objectifs de la thèse 105
Matériel et méthodes 107
1. Recrutement des populations d'intérêt 108
1.1. Comparaison des déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones au Togo et au Bénin, en fonction du lieu de recrutement 108
1.2. Comparaison des déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones en Afrique de l'Ouest, en Italie, en France et au Mexique 109
1.2.1. Population d'Afrique de l'Ouest 109
1.2.2. Population d'Italie 109
1.2.3. Population du nord-est de la France 109
1.2.4. Population du Mexique 109
1.2.5. Prélèvements sanguins 110
1.3. Comparaison des déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones au Togo et au Bénin, en fonction du lieu de recrutement. Etude d'association avec l'hépatite virale B 110
1.4. Comparaison des déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones. Etude d'association avec la gravité du paludisme 110
1.5. Comparaison des déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones. Etude d'association avec l'obésité et le syndrome métabolique 110
2. Analyses biochimiques 112
2.1. Dosage de l'homocystéine 112
2.1.1. Dosage de l'homocystéine par le système IMx 112
2.1.2. Dosage de l'homocystéine par la technique LC/MS/MS 115
2.2. Dosage quantitatif et simultané de la vitamine B12 et des folates 117
2.3. Dosage de l'holo-TC (holo-transcobalamine) sérique par MEIA 119
2.4. Dosage de la Superoxyde dismutase (SOD) 120

2.5. Dosage de la Glutathion peroxydase (GSH-Px) 122
2.6. Dosage des apolipoprotéines A1 et B 124
2.7. Dosage de l'insuline par la technique radio-immunologique 125
3. Analyses génétiques 126
3.1. Extraction d'ADN génomique du sang 126
3.2. Génotypage de Méthylènetétrahydrofolate réductase *MTHFR* 127
3.2.1. Méthylènetétrahydrofolate réductase 1 et 2 par technique en Light Cycler 1.2 129
3.2.2. Méthylènetétrahydrofolate réductase 1 par technique en Light Cycler LC 480 129
3.2.3. Méthylènetétrahydrofolate réductase 2 par technique en Light Cycler LC 480 131
3.3. Génotypage de la méthionine synthase 133
3.3.1. Génotypage de la méthionine synthase par la technique en Light Cycler 1.2 133
3.3.2. Génotypage de la méthionine synthase par la technique en Light Cycler LC 480 135
3.4. Génotypage de la méthionine synthase réductase 137
3.4.1. Génotypage de la méthionine synthase réductase par technique *RFLP* 137
3.4.2. Génotypage de la méthionine synthase réductse par la technique en Light Cycler LC 480 139
3.5. Génotypage de la transcobalamine II 141
3.5.1. Génotypage de la transcobalamine II par technique *RFLP* 141
3.5.2. Génotypage de la transcobalamine II par technique en Light Cycler LC 480 143
3.6. Génotypage de *Tumor Necrosis Factor* alpha par technique en Light Cycler LC 480 145
3.7. Génotypage de l'*Interleukine 1*-α par technique en Light Cycler LC 480 147
3.8. Génotypage de l'*Interleukine 1*-β par technique en Light Cycler LC 480 149

4. Analyses statistiques 151

Résultats et discussion **152**

1.1. Allèles 677T et 1298C du gène de la MTHFR et statut en folates : étude comparative entre Afrique de l'Ouest selon les régions, côtières/urbaines et savane/secteur rural, Mexique, Italie et France (Publications A, B, C) 153
1.2. Discussion 155

2. Allèles 776 G du gène de la transcobalamine (TCN 776 C>G) et statut en folates et vitamine B12 : étude comparative entre Afrique de l'Ouest, Mexique, Maroc, Italie et France (Publication D) 184
2.1. Résultats 184
2.2. Discussion 187
3. Déterminants nutritionnels et génétiques du métablisme des monocarbones : association avec l'hépatite virale B en Afrique de l'Ouest (Publication E) 197
3.1. Résultats 197
3.2. Discussion 200
4. Déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones : association avec la gravité du paludisme en Afrique de l'Ouest 214
4.1. Résultats 214
4.1.1. Caractéristiques de la population étudiée selon le sexe 214
4.1.2. Déterminants cliniques et biologiques par gravité du paludisme 215
4.1.3. Quels sont les principaux paramètres de gravité en association avec l'âge et le sexe chez le paludéen? 216
4.1.4. Existe-t-il une association entre les polymorphismes du métabolisme de l'homocystéine et les formes de paludisme ? 217
5. Déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones : association avec l'obésité et le syndrome métabolique 223
5.1. Etude comparative du syndrome métabolique dans les populations enquêtées 224
5.2. Le syndrome métabolique est-il en lien avec le métabolisme de l'homocystéine 225
5.3. Le syndrome métabolique est-il associé aux déterminants cliniques et biologiques après stratification selon le sexe ? 227
5.4. Existe-t-il une association entre le déterminants cliniques et biologiques du SM avec les déterminants lipidiques? 230
5.5. Les déterminants génétiques de l'homocystéine ont-ils une influence sur les déterminants clinico-biologiques du SM ? 237

Discussion **242**
Conclusion générale **247**
Références bibliographiques **250**

ABREVIATIONS

AACE	*American Association of Clinical Endocrinologists*
ACRP30	*adipose complement related protein of 30 kDa*
Ado	adénosine
Ado-cbl	adénosyltranscobalamine
AFTN	anomalies de fermeture du tube neural
ALAT	alanine aminotransférase
AMPK	*activated mitogen protein kinase*
APM 1	*adipose most abundant gene transcript 1*
ASAT	aspartate aminotransférase
AVC	accidents vasculaires cérébraux
CETP	*cholesterol ester transfer protein*
CH_3-cbl	méthyltranscobalamnie
CBS	cystathiotine –β-shyntase
CGL	Cystéine γ- Lyase
CN-cbl	cyanocobalamine
DSVG	dysfonction systolique du ventricule gauche
DHFR	dihydrofolte réductase
DHPS	dihydroptéroate synthase
EGIR	*european group for the study of insulin resistance*
eNOS	*endotelial isoform of nitricoxide synthase*
FE	fraction d'éjection
FEVG	fraction d'éjection du ventricule gauche
GBP28	*gelatin- binding protein 28*
GSH-Px	glutathion peroxydase
H_2O-cbl	aquacobalamine
Hcy	homocystéine
HDL	lipoprotéine à haute densité
HMG-coA	hydroxy-méthyl-glutamyl-coenzyme A
HTA	hypertension artérielle
HsSAHH	S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase humaine
HUVEC	*human umbilical vein endothelial cells*
IC	intervalle de confiance

ICAM-1	*intercellular adhesion molecule 1*
IDF	*international diabetes federation*
IL	interleukine
IMC	indice de masse corporelle
JNC	*joint national committee*
LPS	lipopolysaccharide
LDL	lipoprotéine à basse densité
MAP	protéine activatrice de la mitogenèse
MAT	méthionine-adénosyl-transférase
MC	maladie coronaire
MCP-1	*monocyte chemotactic protein*
MCV	maladies cardiovasculaires
MMPs	métallloprotéinases
MNT	maladie non transmissible
MS	méthionine synthase
MTHF	méthyltétrahydrofolate
MTHFR	méthylènetétrahydrofolate réductase
MTR	gène de la méthionine synthase
MTRR	gène de la méthionine synthase réductase
NCEP ATPIII	*national cholesterol education program adult treatment panel III*
NO	oxyde nitrique
NT-proBNP	peptide natriurétique de type B
NYHA	*New York heart association*
OD	odds ratio
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAI-1	*plaminogen activator inhibitor-1*
PAS	pression artérielle systolique
PCR	*polymerase chain reaction*
Pf SAHH	S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase du *Plasmodium falciparum*
PL	pyridoxal
PLP	phosphate de pyridoxal
PM	pyridoxamine
PMP	pyridoxamine 5’ -phosphate
PN	pyridoxine

PON-HDL	paraxonase associée aux lipoprotéines de haute densité
PPAR-γ	*peroxisome proliferator activated receptor gamma*
RE	réticulum endoplasmique
ROS	*reactive oxygen species*
RR	risque rélatif
SAH	S-adénosyl-L-homocystéine
SAHH	S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase
SAM	S-adénosyl-L-méthionine
SM	syndrome métabolique
SOPK	syndrome d'ovaires polykystiques
SREBPs	*sterol regulatory element binding proteins*
t-Hcy	total homocystéine
TC	transcobalamine
TCN	gène de la transcobalamine
TGF-β	*transforming growth factor*-β
TNF-α	*tumor necrosis factor alpha*
TNFR-1	*tumor necrosis factor receptor* 1
TZD	thiazolidinedione
VCAM-1	*vascular cell adhesion molecule* 1
WHO	*world health organization*

Liste des figures

Figure 1. Schéma simplifié du métabolisme des monocarbones 23

Figure 2. Les formes circulantes de l'homocystéine 26

Figure 3. Structure de l'acide folique 29

Figure 4. Structure de la vitamine B12 31

Figure 5. Gènes des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'Hcy 37

Figure 6. Homocystéine et inflmmation 41

Figure 7. Distribution mondiale du paludisme 43

Figure 8. Cycle de vie du parasite et pathogénie du paludisme à *P. falciparum* 47

Figure 9. Diagramme d'un globule rouge 60

Figure 10. Schéma de la structure du cholestérol 75

Figure 11. Schéma de la synthèse du cholestérol 76

Figure 12. Principaux sites d'action de l'insuline 92

Figure 13. Composantes du SM, traitements médicamenteux et mécanismes 98

Figure 14. Concentration en acide méthylmalonique chez les porteurs de géntotype *TCN 776GG* 219

Figure 15. Association acide méthylmalonique et hémoglobine dans le paludisme grave 220

Figure 16. Association parasitémie et hémoglobine dans le paludisme grave 220

Figure 17. Association parasitémie et folates dans le paludisme simple 221

Figure 18. Association parasitémie et homocystéine dans le paludisme grave 221

Liste des tableaux

Tableau 1. Valeurs normales et pathologiques de l'homocystéine 26

Tableau 2. Causes d'hyerhomocystéinémie 27

Tableau 3. Ensemble des facteurs de risque associés au syndrome métabolique 63

Tableau 4. Critères de classification du syndrome métabolique selon l'IDF 64

Tableau 5. Classification de la tension artérielle selon JNC 89

Tableau 6. Descriptif général des déterminants du paludisme en fonction du sexe 214

Tableau 7. Déterminants cliniques et biologiques par gravité du paludisme selon l'OMS 215

Tableau 8. Déterminants cliniques et biologiques du paludisme grave en analyse multivariée 217

Tableau 9. Déterminants de la parasitémie en analyse multivariée selon la gravité du paludisme 217

Tableau 10. Distribution des génotypes et allèles des polymorphismes du métabolisme de l'homocystéine en fonction de la gravité du paludisme 218

Tableau 11. Fréquence du Syndrome Métabolique, selon la classification IDF 225

Tableau 12. Descriptif général des déterminants cliniques et biologiques 226

Tableau 13. Déterminants cliniques et biologiques du syndrome métabolique selon le sexe 228

Tableaux14a-c. Déterminants cliniques et biologiques du SM avec les déterminants lipidiques chez les femmes 231

Tableaux 14 d-f. Déterminants cliniques et biologiques du SM avec les déterminants lipidiques chez les hommes 234

Tableau 15 a. Déterminants génétiques des variables biologiques et cliniques

chez les femmes 238

Tableau 15 b. Déterminants génétiques des variables biologiques et cliniques chez les hommes 239

Tableau 16 a. Déterminants de la concentration plasmatique d'homocystéine en analyse uni et multivariée, chez les femmes 240

Tableau 16 b. Déterminants de la concentration plasmatique d'homocystéine en analyse uni et multivariée, chez les hommes 241

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'homocystéine

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré formé au niveau intracellulaire à partir de la méthionine apportée par l'alimentation. L'Hcy n'est pas codée génétiquement et est absente des protéines. Elle est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme. Le catabolisme de l'Hcy se produit principalement dans le foie et dans les reins par deux voies: la voie de la reméthylation et la voie de la transulfuration (Figure 1).

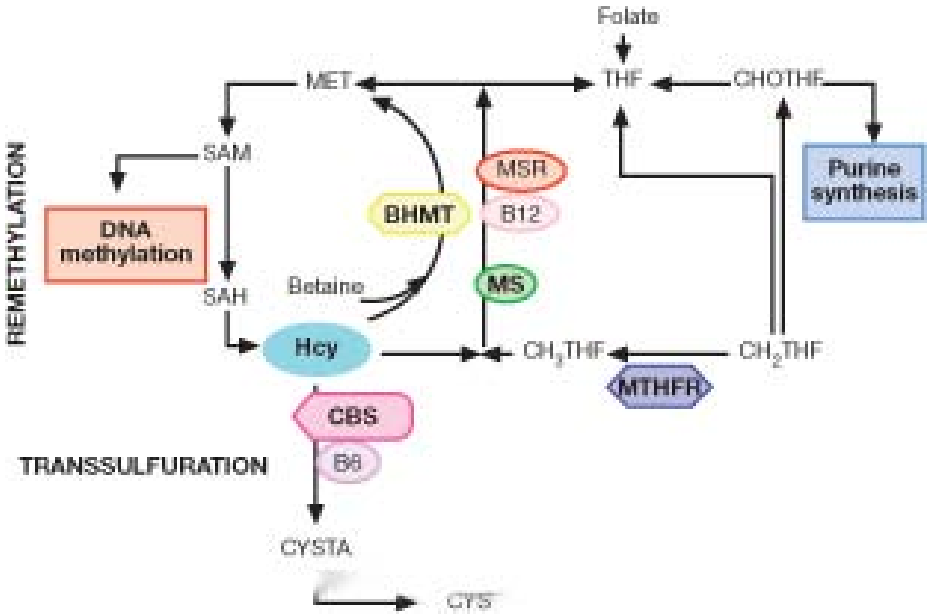


Figure 1. **Schéma simplifié du métabolisme des monocarbones.** Tetrahydrofolate (THF), formyltetrahydrofolate (CHOTHF), 5,10-méthylènetétrahydrofolate(CH2THF), 5-méthylènetétrahydrofolate (CH3THF), homocystéine (Hcy), méthionine (MET), S-adénosylméthionine (SAM), S-adénosylhomocystéine (SAH), cystathionine (CYSTA), cystéine (CYS), 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR), méthionine synthase (MS), méthionine synthase réductase (MSR), bétaïne-homocystéine méthyltrasférase (BHMT), cystathionine β-synthase (CBS) (Terruzi et al., 2007).

1.1. La voie de la reméthylation

Elle assure la reméthylation de l'Hcy en méthionine selon deux réactions enzymatiques distinctes.

La principale réaction fait intervenir deux enzymes : la 5-méthylènetétrahydrofolate (5-MTHF), donneuse de groupement méthyl dont la formation est sous la dépendance d'une enzyme, la 5,10-MTHF réductase, et la méthionine synthase (MS) dont le cofacteur est la vitamine B12.

Ce transfert du groupe méthyl, qui permet la synthèse de la méthionine, n'est possible qu'en présence de méthylcobalamine ; d'où la synergie d'action entre la vitamine B9 et la vitamine B12.

La deuxième réaction se déroule en grande partie au niveau du foie. Elle est de faible activité, et fait intervenir une enzyme hépatique, la bétaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT).

La bétaïne est la molécule donneuse de groupement méthyl.

Mais cette voie est moins importante que la précédente au niveau de la paroi vasculaire et même absente dans certains tissus, comme le tissu myocardique (Chen et al., 1999).

En effet, l'importance relative de ces deux voies de reméthylation varie en fonction du tissu considéré et du statut protéique. En cas d'apport protéique excessif, la voie de la transsulfuration est favorisée, à l'inverse en cas de déficit protéique, la voie de la reméthylation est favorisée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant en méthionine.

1.2. La voie de la transsulfuration

La majorité de l'Hcy n'est pas reméthylée mais catabolisée en cystéine par la voie de la transsulfuration. Cette voie permet à la méthionine d'apporter un atome de soufre pour la formation de cystéine. L'activation de la méthionine en S-adénosyl-L-méthionine (SAM) se fait sous l'influence de la méthionine-adénosyl-transférase (MAT). La SAM, principal donneur de groupement méthyl de l'organisme, cède ensuite ce groupement pour donner

naissance à la S-adénosine-L-homocystéine (SAH). Cette molécule est hydrolysée en adénosine et en homocystéine par la S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase (SAHH).

Sous l'influence de la cystathionine-β-synthase (CBS), l'Hcy se condense ensuite avec la sérine pour former la cystathionine, elle même clivée et désaminée en cystéine et en α-céto butyrate (par la cystéine -γ -lyase [CGL]).

Ces deux réactions nécessitent la présence d'un cofacteur enzymatique, le phosphate de pyridoxal ou vitamine B6.

Contrairement aux autres voies métaboliques, cette dernière est irréversible, ce qui a pour conséquence que la cystéine ne peut être un précurseur pour la synthèse de méthionine. Ce fait revêt surtout une importance dans le cadre de recommandations diététiques.

1.3. L'homocystéine circulante

1.3.1. Les différentes formes physicochimiques d'homocystéine circulantes

Il est important de comprendre le terme « homocystéine totale » (t-Hcy) dans un sens biochimique, parce que ceci aura une pertinence dans les discussions qui suivent sur la méthodologie et sur les mécanismes pathophysiologiques. Le plasma humain contient des quantités réduites et oxydées d'Hcy (Mc Cully, 1975).

Des définitions chimiques ont été établies par Butz et du Vigneaud il y a plus de 70 ans (1932). Le sulfhydryle ou la forme réduite s'appelle homocystéine et le bisulfure ou la forme oxydée s'appelle homocystine. Les formes du bisulfure existent également avec de la cystéine et avec des protéines contenant les résidus réactifs de cystéine (homocystéine liée aux protéines). Les dernières formes oxydées sont désignées sous le nom des disulfides mélangés.

Les formes oxydées d'homocystéine comportent habituellement 98–99% de l'homocystéine totale dans le plasma humain, 80–90% sont liées aux protéines (Mc Cully, 1975) (Figure 2).

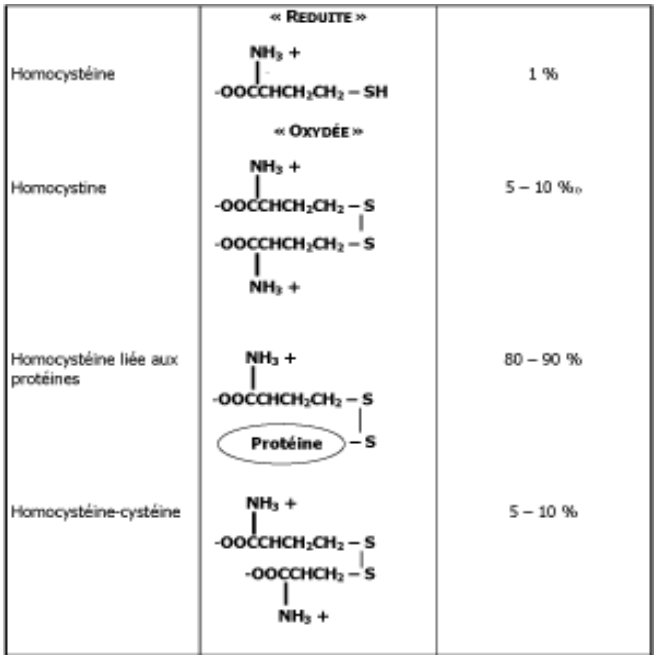


Figure 2. Formes circulantes de l'homocystéine.
Une grande partie d'Hcy est liée aux protéines (80-90%).

L'Hcy totale est donc la somme de toutes les formes d'Hcy qui existent dans le plasma ou sérum.

Sur la base des travaux menés, la gamme de la concentration totale en Hcy dans le plasma « des adultes en bonne santé » est 5–15 µmol/L (Tableau 1) (Ueland et al., 1993).

	Homocystéine µmol/L
Normal	5 – 15
Souhaitable	< 10
Hyperhomocystéinémie	
Modérée	16 – 25
Intermédiaire	26 – 50
Sévère	> 50

Tableau 1. Valeurs normales et pathologiques d'homocysteine.

Cependant, il faut être prudent dans l'utilisation de prétendues « gammes normales » pour l'homocystéine. Certains travaux ont prouvé que le risque pour la MC est représenté par un

continuum de concentration totale en homocystéine, avec le risque substantiel se produisant entre 10 et 15 µmol/L (Robinson et al., 1995).

Dans la plupart des cas**,** les évènements cardiovasculaires surviennent avec des hyperhomocystéinémies modérées (15–25 µmol/L) (Ueland et al., 1992; Green et al., 1995; Mayer et al., 1996). Cependant, si la fonction rénale est altérée, le taux de t-Hcy peut atteindre les concentrations intermédiaires (25–50 µmol/L) (Dennis et al., 1996; Bostom et al., 1997).

2. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

Les déterminants de l'Hcy totale plasmatique sont complexes et impliquent des déterminants environnementaux, nutritionnels et génétiques.

	Hyperhomocystéinémies	
Causes	**Intermédiaire et modérée (16 – 50 µmol/L)**	**Sévère (> 50 µmol/L)**
Génétiques	Déficit hétérozygote en CBS Polymorphisme *MTHFR C677T*	Déficit homozygote en CBS Déficit homozygote en MTHFR Déficit en méthionine synthase
Nutritionnelles	Déficit en folates Déficit en Vitamine B6 Déficit en Vitamine B12	
Thérapeutiques	Anticonvulsivantes Méthotrexate Phénytoïne Monoxyde d'azote Azaribine	
Etats pathologiques	Insuffisance rénale chronique hypothyroïdie Psoriasis Arthrite rhumatoïde Diabète type II Cancers (pancréas, sein, ovaire)	

Tableau 2. Causes d'hyperhomocystéinémie.

2.1. Les déterminants environnementaux

Les principaux facteurs environnementaux qui contribuent à une hyperhomocystéinémie modérée, incluent l'âge, le sexe, certains médicaments et différentes conditions pathologiques. Les personnes âgées ont des taux plus élevés d'Hcy. Dans ce groupe d'âge, le statut vitaminique a une influence majeure (Selhub et al., 1993). Les hommes ont une Hcy plus élevée que les femmes, due à une plus grande masse musculaire ou aux effets sur les hormones sexuelles (Jacobsen et al., 1994; Anderson et al., 1992).

L'hyperhomocystéinémie modérée peut être liée à la prise des certains médicaments comme le methotrexate, la phénytoïne, la carbamazepine qui interférent avec le métabolisme des folates, le monoxyde d'azote, qui inactivent la vitamine B12, l'azaribine qui empêche l'activité de la CBS (Ueland et al., 1992). Les contraceptifs, la pénicillamine ou les oestrogènes oraux diminuent l'Hcy (Ueland et al., 1989). Mais d'une manière générale, des suppléments en folates et/ou en vitamine B12 sont suffisants pour abaisser le taux d'Hcy (Ueland et al., 1989). Des conditions pathologiques comme l'hypothyroïdie, l'insuffisance rénale, les affections inflammatoires (notamment intestinales), l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, le diabète de type II, les maladies lymphoprolifératives et certains cancers (sein, ovaire, pancréas) peuvent augmenter les taux d'Hcy (De Bree et al., 2002).

2.2. Facteurs nutritionnels

2.2.1. Les folates ou vitamine B9

La vitamine B9, comme toutes les vitamines du groupe B, est hydrosoluble. La vitamine B9, ou folacine, est aussi appelée acide folique pour la forme synthétisée servant de supplément et folates pour celle présente naturellement dans les aliments.

Les caractéristiques générales

Le terme de « folates » (ou folacine ou vitamine B9) qualifie l'ensemble des composés dans lesquels l'acide ptéroïque est lié à une ou plusieurs molécules de glutamate (Figure 3).

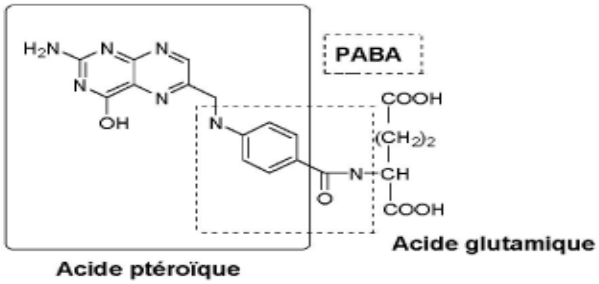


Figure 3. Structure de l'Acide folique.

La plus grande partie de l'acide folique est présente dans les aliments sous forme de polyglutamates (entre 1 et 7 résidus glutamates reliés en chaîne au glutamyl constitutif). L'absorption se fait au niveau du duodénum et du jéjunum, après hydrolyse en monoglutamate; c'est un processus actif saturable très dépendant du pH et du sodium. Le sang portal achemine l'acide ptéroylglutamique au foie où il est méthylé (Guilland, 1992).

C'est sous cette forme que la molécule est transportée dans le sérum, excrétée dans la bile, puis réabsorbée. Ce cycle entérohépatique représente une très forte circulation quotidienne de folates (>80 µg/jour) et constitue une voie importante de redistribution de l'acide folique aux tissus périphériques.

Les fonctions physiologiques

Les folates facilitent le transfert des unités monocarbonées à partir de multiples biomolécules vers des nombreuses réactions biosynthétiques telles que la synthèse de purine et de pyrimidine, la synthèse de la méthionine à partir de l'Hcy. Un apport adéquat en folates est essentiel pour la division cellulaire et l'homéostasie, en produisant de l'ADN (Scott et al., 1998).

Réduction de l'acide folique

Pour être métaboliquement active, la molécule doit être réduite par une enzyme, la dihydrofolate réductase (DHFR) qui fixe d'abord 2, puis 4 atomes d'hydrogène sur la molécule, ce qui explique sa grande sensibilité à l'oxydation. Ainsi, le ptéroylglutamate subit une double réduction en THF (tétrahydrofolate).

Méthylation du THF

La fixation des groupements monocarbonés en 5 et 10 conduit aux formes circulantes et actives (5,10-MTHF et 5-MTHF).

Déméthylation du 5-MTHF

La molécule de 5-MTHF véhiculée par le sérum doit être déméthylée pour intégrer le cycle folique cellulaire, et ce transfert de méthyl qui permet la synthèse de la méthionine, nécessite la MTHFR et son cofacteur enzymatique, la méthylcobalamine.

C'est en tant que donneur de méthyl que l'acide folique joue un rôle fondamental dans le métabolisme de l'Hcy et, par voie de conséquence, dans le métabolisme cérébral et nerveux.

2.2.2. La vitamine B12

La vitamine B12 appartient à la famille des corrinoïdes. Elle est constituée d'un noyau corrine et d'un ribonucléotide reliés entre eux par un pont amino2- propanol (Figure 4)

- le ribonucléotide : il résulte de la condensation de la 5,6 - diméthylbenzimidazole (= base azotée) avec un sucre, le ribose 3' phosphate.

Le noyau corrine : il est formé d'un atome de Cobalt (Co) central relié à 4 noyaux pyrroles ainsi qu'à un ligand anionique (- X), dont la nature permettra de définir :

* La cyanocobalamine (- X = - CN), l'hydroxocobalamine (- X = -OH) : ces 2 composés sont à Co 3+, stables et utilisés en thérapeutique.

* La méthylcobalamine (- X = - CH3), et la 5'-désoxyadenosyl cobalamine (- X = -5'd Ad) sont les formes coenzymes actives (avec Co 1+).

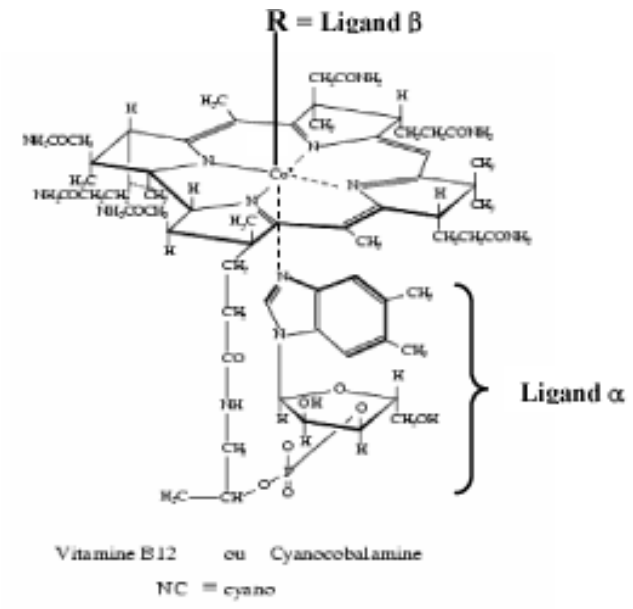


Figure 4. Structure de la vitamine B12 ou cobalamine (Guéant et Namour, 2003).

Métabolisme

La vitamine B12 est présente dans les aliments d'origine animale et est exclusivement synthétisée par des bactéries. Liée aux protéines, elle est libérée du support alimentaire dans l'estomac sous l'effet du pH acide. L'absorption digestive (iléon) nécessite la liaison à une protéine, le facteur intrinsèque synthétisé par les cellules pariétales gastriques. Le transport est assuré par des transporteurs spécifiques : les transcobalamines I, II, III.

La transcobalamine II

Elle est la plus importante car elle fixe plus de 80 % de la vitamine B12 absorbée. C'est une glycoprotéine de 38 000 Da synthétisée par divers tissus et cellules (hépatocytes, entérocytes, macrophages, cellules médullaires). Elle délivre la vitamine B12 aux cellules utilisatrices (moelle osseuse, foie, glandes endocrines) par un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant**.**

Les transcobalamines I et III

Ce sont des glycoprotéines ubiquitaires (PM = 120 000 Da) produites essentiellement par les granulocytes, surtout les promyélocytes et myélocytes. Elles transportent la B12 sans la distribuer aux cellules utilisatrices.

2.2.3. La vitamine B6

La vitamine B6, en tant que cofacteur de la CBS et de la CGL (voie de transulfuration) est un important modulateur des taux plasmatiques d'Hcy.

Le terme « vitamine B6 » désigne 6 composés : le pyridoxal (PL), la pyridoxine (PN), la pyridoxamine (PM), et leurs dérivés phosphorylés respectifs, le pyridoxal 5'-phosphate (PLP), la pyridoxamine 5'-phosphate (PMP), et la pyridoxine 5'-phosphate (PNP).
Nous nous intéresserons seulement au phosphate de pyridoxal ou PLP.

Métabolisme

Dans la lumière de l'intestin grêle, le PLP et le PMP présents dans les produits animaux sont hydrolysés par une phosphatase pour être absorbés sous forme de PL et de PM par l'entérocyte, par un mécanisme de diffusion passive non saturable (Guilland, 1992).
Le PLP est formé par phosphorylation du PL catalysé par la pyridoxal kinase. Certains tissus (le foie, le cerveau et les érythrocytes) peuvent synthétiser le PLP à partir de la PN (présents dans les produits végétaux).
Le foie est le principal site de synthèse du PLP et c'est le seul organe capable de libérer dans le sang la vitamine B6, sous forme de PLP. Le rôle très important de ces vitamines du groupe B comme cofacteurs enzymatiques et comme substrats dans le métabolisme de l'Hcy explique la relation inverse entre les taux plasmatiques d'Hcy et ceux de vitamines B9, B6 et B12.

2.3. Facteurs Génétiques

Les polymorphismes ou variants génétiques du génome sont secondaires à des mutations qui sont le plus souvent des mutations uniques (*single nucleotide polymorphism* ou SNP). Environ 3 millions de polymorphismes dans l'ensemble du génome humain ont été rapportés (Cardon et Palmer, 2003). Il existe plusieurs polymorphismes des enzymes intervenant dans le cycle des folates et la reméthylation de l'homocystéine. Il s'agit principalement de variants

génétiques des enzymes MTHFR (677 C→T, 1298 A→C et 1317T→C), MS (2756 A→G), MSR (66 A→G). De plus, un polymorphisme portant sur une protéine de transport de la vitamine B12, la transcobalamine, a été rapporté et peut également s'associer à une hyperhomocystéinémie relative (TCN 776 C→G) (Namour *et al.,* 2003). L'incidence fonctionnelle d'un polymorphisme enzymatique donné n'est pas toujours connue. Cependant, les polymorphismes des enzymes du cycle des folates (MTHFR et MS) affectent notamment le statut en homocystéine des sujets et conditionnent les besoins nutritionnels relatifs de la population concernée en vitamines du groupe B.

2.3.1. Les polymorphismes du gène MTHFR C677T, A1298C, T1317C

Le gène de la MTHFR fut localisé par Goyette et al. en 1994, dans le chromosome 1. Le gène de la MTHFR comprend 11 exons (Goyette et al. 1998). Plus tard, Gaughan 2000 et al. ont montré que le gène ne contient pas TATA box, mais contient plusieurs ilôts CpG très importants pour les sites d'union pour les autres facteurs de transcription. MTHFR catalyse la formation de 5 méthyl-THF à partir de méthylène-THF 5.10. Ce dérivé méthylé du THF est nécessaire pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine.

Le polymorphisme C677T (substitution d'une alanine pour une valine dans la séquence protéique) rend MTHFR thermolabile avec une diminution de 50% de son activité (Frosst et al. 1995). Deux autres polymorphismes de type SNP ont été identifiés dans le gène *MTHFR, A1298C* et une mutation silencieuse *T1317C* (Akar et al. 2000).

La prédominance du polymorphisme *C677T* est relativement élevée dans la population générale; la prédominance des homozygotes *677TT* de cette mutation autosomique récessive, est de 5 à 15% et 50% d'hétérozygotes dans les populations caucasienne et asiatique ; il existe

une faible incidence dans les populations africaine et américaine (Bailey et al. 1999; Brattström et al. 1998 ; Adjalla et al., 2003).

La concentration de t-Hcy est d'autant plus élevée chez les porteurs du génotype *677TT* que le statut folique est déficient (Jacques et al., 1996; Brattström et al., 1998; Mc Quillan et al., 1999; de Bree, 2001) ou qu'il existe des apports insuffisants (McQuillan et al. 1999; de Bree, 2001). Il existe d'autres polymorphismes, dont le plus fréquent est *A1298C*. Ce polymorphisme considéré isolément n'a pas d'influence sur la concentration en Hcy.

2.3.2. Le polymorphisme MTR A2756G

La reméthylation de l'homocystéine en méthionine nécessite une enzyme, la 5-méthyltétrahydrofolate-homocystéine S-méthyltransférase, mieux connue sur le nom de méthionine synthase (MS). Cette enzyme a comme cofacteur la vitamine B12.

En 1996 Li et al. ont isolé et caractérisé le gène humain de la MS (*MTR* dans la nomenclature des gènes). Comme pour *MTHFR*, le gène codant pour l'enzyme se trouve dans le chromosome 1 (1q43) (Leclerc et al., 1996).

Les mutations de *MTR* peuvent produire une diminution de l'activité de l'enzyme et par conséquent une élévation de l'Hcy. Le polymorphisme *A2756G* (substitution d'un résidu d'acide aspartique par la glycine) a été décrit par (Leclerc et al., 1996; Chen et al., 1997). La diminution de l'activité enzymatique joue un rôle dans la tumorigénèse et dans le retard mental lorsqu'elle est associée à un statut insuffisant en vitamine B12 ou à un polymorphisme de la MTHFR (677 C→T) (Wilson et al., 1998). Ce polymorphisme a donc été étudié principalement dans les anomalies du tube neural et du Syndrome de Down (Li et al., 1996; Gulati et al., 1996; Doolin et al. 2002; Bosco et al., 2003). La relation entre ce polymorphisme et les MCV a été étudiée plus récemment (Zhang et al., 2004).

2.3.3. Le polymorphisme MTRR A66G

La reméthylation de l'Hcy en méthionine nécessite la MS dont le cofacteur est la cob(I)alamine, ensuite la cob(I)alamine est oxydée en cob(II)alamine, ce qui rend la MS inactive. La méhionine synthase reductase (MSR) régénère la forme fonctionnelle de la cobalamine (Brown et al., 2000).

Un polymorphisme du gène de la MSR (*MTRR A66G*) se traduit par une substitution d'une isoleucine par une méthionine dans la séquence protéique. *MTRR GG* peut théoriquement influencer le transport cellulaire et le métabolisme de la vitamine B12.

2.3.4. Le polymorphisme TCN C776G

La transcobalamine II (TCII) est une globuline plasmatique de transport de la vitamine B12. Son absence provoque une anémie mégaloblastique sévère détectée dès l'enfance (Hakami et al., 1971). Le gène (*TCN*) de la TCII peut présenter plusieurs polymorphismes à l'origine de modifications de la concentration plasmatique en homocystéine. La mutation la plus commune correspond à la substitution d'une base cystine en guanine en position 776 (*C776G*) (Namour et al., 2001). La conséquence au niveau protéique est le remplacement d'un acide aminé arginine aux dépens d'une proline (codon 259) (Namour et al., 2001). L'allèle *TCN 776 G* diminue la transcription de la TCII et il existe par conséquent une diminution de la concentration plasmatique en TCII. L'influence faible de l'allèle *TCN 776 G* sur la concentration de l'Hcy a été documentée dans des populations Caucasiennes (Namour et al., 2001, Miller et al., 2002).

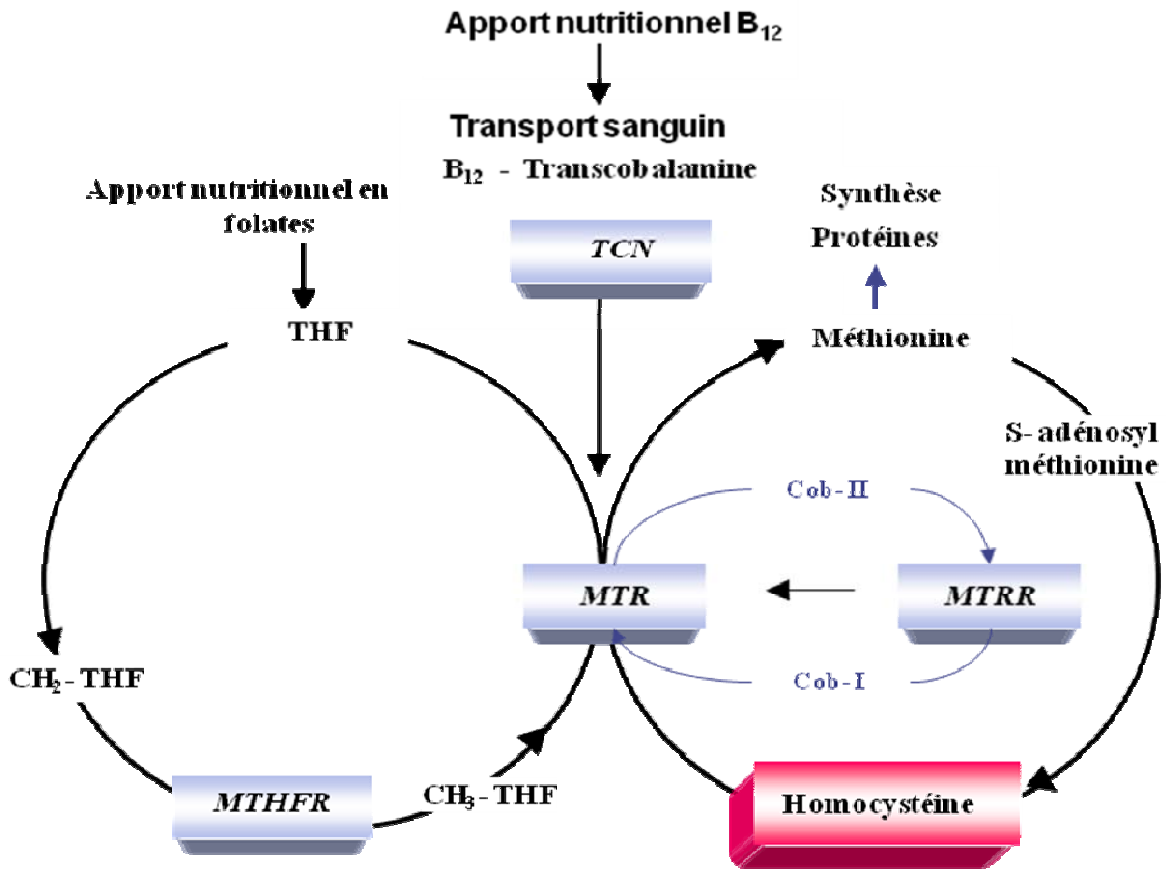


Figure 5. Gènes des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine.

3. Inflammation.

Des études sur des cellules en culture ont démontré que l'Hcy induit la production de plusieurs cytokines proinflammatoires. L'exposition à l'Hcy de plusieurs types cellulaires en culture, cellules vasculaires endothéliales humaines, cellules musculaires lisses et monocytes, induit l'expression de la protéine chémotactique de monocytes 1 (MCP-1) (Poddar et al., 2001, Wang et al., 2001a, Wang et al., 2001b). MCP-1 augmente l'attachement des monocytes à l'endothélium et à leur recrutement à l'espace sous- endothélial, une étape critique dans le développement de la lésion athérosclérotique. L'Hcy augmente également l'expression d'IL-8 (Poddar et al., 2001), un lymphocyte T et neutrophile chémoattractant.

L’augmentation de l’expression de MCP-1 et d’IL-8 par l’Hcy est médiée par l’activation du NF-kB, un facteur de transcription connu pour stimuler la production des cytokines, des chémokines, des molécules d'adhérence de leucocyte, et des facteurs hématopoiétiques de croissance, contribuant ainsi à l'inflammation vasculaire et à l’athérogenèse (Ross 1999; Fuster, 1994; Berliner et al., 1995). Des observations récentes sur des souris Apo-E déficientes et avec une hyperhomocystéinémie modérée induite, montrent une activation du NF-kB et par conséquent une production des médiateurs pro-inflammatoires et des cytokines sur les lésions athérosclérotiques (Hofmann et al., 2001; Zhou et al., 2003).

3.1. TNF alpha et homocystéine

Le Tumor Necrosis Factor-alpha (*TNF-α*) est une cytokine pro-inflammatoire mutifonctionnelle. Le *TNF-α* a des effets sur le métabolisme de lipides, la coagulation, l’insulinorésistance et la fonction endothéliale. *In vivo*, le *TNF-α* est capable d’induire une nécrose hémorragique (Carswell et al., 1975). *In vitro*, le *TNF-α* a des effets cytostatiques et cytotoxiques contre les cellules tumorales humaines (Fiers, 1991). Les effets cytotoxiques proviennent du Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (TNFR-1) (Lehman et al., 1986; Loetscher et al., 1990; Schall et al., 1990), protéine de 55-60 kDa. Les mécanismes pour lesquels le TNF-α induit une cytotoxicité sont variables, ils incluent la formation de la Caspase 8 (Vercammen et al., 1998), l’activation de la Phospholipase A2 (Suffys et al., 1987), la génération des espèces réactives à l’oxygène (ROS) (Zimmerman et al., 1989; Schultz-Osthoff et al., 1992], et les altérations de l’ADN (Dealtry et al., 1987).

En plus des effets cytotoxiques bien connus, il semblerait que le TNF-α puisse affecter l’expression et/ou l’activité des enzymes du métabolisme de l’Hcy, par plusieurs mécanismes.

3.2. TNF alpha et S-adénosylméthionine

Il a été suggéré que la S-adénosylméthionine (SAM) a une influence sur la cytotoxicité du TNF-α. Ce processus peut impliquer les Protéines G (Clarke et al., 1992) et la transméthylation. L'inhibition de réactions de transméthylation est associée à une surproduction du TNF-α. En effet, sur un modèle cellulaire avec des cellules tumorales, il a été montré que les cellules exposées à l'adénosine et/ou à l'Hcy, produisent plus de TNF-α (Ratter et al., 1999).

Sur un modèle animal d'alcoolisme, la relation entre le TNF-α et la SAM a été testée avec des souris *wild-type* et *knockout* en TNFR-1. Ces souris ont été exposées à l'alcool par voie intra gastrique pendant 4 semaines. Les résultats montrent que les niveaux plasmatiques d'Hcy étaient 7.4 fois plus élevés chez les souris *wild-type* et de 6.1 chez les souris *knockout* en TNFR-1. Dans ce même modèle, pour tester l'hypothèse que les taux élevés en TNF-α dépendaient de la SAM, certaines souris ont reçu un régime riche en bétaïne, la différence entre les deux groupes de souris n'était pas significative (Ji et al., 2003).

3.3. TNF alpha et NF-Kb

On sait que l'altération de la fonction endothéliale joue un rôle principal dans l'athérogenèse, et comme nous l'avons vu précédemment, l'Hcy peut altérer la fonction endothéliale en activant les cellules endothéliales, pré-requis pour le recrutement de leucocytes vers les plaques athérosclérotiques. Des stimuli extracellulaires comme les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et le TNF-α activent la cascade de transduction dans laquelle converge le facteur de transcription NF-kB (May et al., 1998 ; Finco et al., 1995). Dans les cellules endothéliales, les cytokines pro inflammatoires activent les gènes NF-kB dépendants, comme

ICAM-1, VCAM-1 ou certaines chémokines comme MCP-1 (Carlos et al., 1994). Dans les cellules en repos, c'est l'unité inhibitrice du NF-kB (IkB) qui prédomine dans le cytoplasme (May et al., 1998 ; Finco et al., 1995). Roth et al., 2001, sur un modèle animal, ont montré que l'Hcy peut causer un déséquilibre entre les différentes voies de signalisation. En effet d'une part, elle inhibe de manière sélective l'expression du TNF-α, et d'autre part, elle empêche l'activation du NF-kB.

3.4. TNF alpha et Cystathionine β-synthase (CBS)

La CBS catalyse la première des deux étapes du cycle de la transulfuration de l'Hcy, elle transforme l'Hcy en cystéine. La cystéine est un précurseur de la glutathionine, l'antioxydant intracellulaire le plus répandu. La glutathionine joue un rôle important dans l'homéostasie intracellulaire et protège les cellules contre un stress oxydant. De manière opposée le TNF-α provoque des lésions au niveau cellulaire par différents mécanismes comme la surproduction des ROS (Li et al., 1998; Morales et al., 1997). Cependant, la capacité du TNF-α de détruire les cellules semblerait être réduite uniquement aux cellules tumorales et virales (Beutler et al., 1988). En effet, les cellules normales sont en général insensibles aux effets cytotoxiques du TNF-α, par un mécanisme très probablement associé à une capacité anti-oxydante, en augmentant la synthèse de glutathionine (Morales et al., 1997; Czaja et al., 1994).

Zou et Banerjee (2003) ont étudié la CBS dans les cellules hépatiques traitées au TNF-α et dans un modèle animal de souris pour évaluer l'effet du lipopolysaccharide (LPS) sur la formation des ROS dans la voie de la transsulfuration. Leurs résultats montrent que le TNF-α augmente l'activité de la CBS et la concentration de gluthation dans les cellules hépatiques, en plus d'une protéolyse ciblée de la CBS dans le foie de souris traitées avec du LPS. Ces données montrent qu'il existe une relation entre la CBS et le TNF-α.

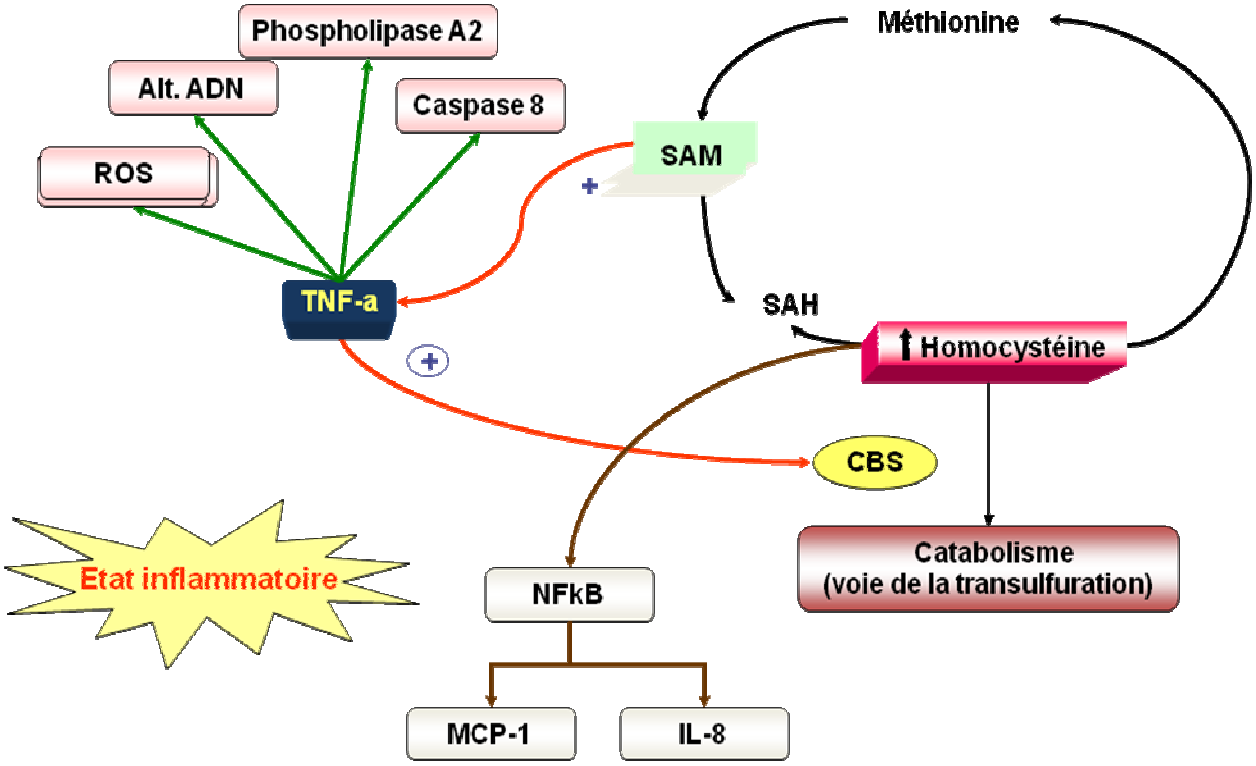


Figure 6. Homocystéine et inflammation. L'homocystéine induit la production des cytokines (TNF-a) qui génèrent les ROS, les altérations de l'ADN et activent la cascade de transduction de NF-kB (ICAM-1 et VCAM-1); la CBS transforme l'Hcy en cystéine.

4. Les pathologies prévalentes en Afrique au sud du Sahara.

Au nombre des pathologies qui menacent cette partie du monde, mis à part cette dernière décennie le Sida, nous citerons l'hépatite virale B, le paludisme et le syndrome métabolique lié à l'obésité.

Dans cette partie de notre introduction bibliographique, nous insisterons plus en détail sur le paludisme et le syndrome métabolique ; car un article tout particulier, dans nos précédents travaux, a été déjà consacré à l'hépatite virale B (Publication E).

4.1. Le paludisme

Le paludisme est une maladie protozoaire transmise par le moustique femelle appelé «anophèle ». La maladie est causée par un petit protozoaire du genre Plasmodium qui infecte alternativement les hôtes humains et les insectes. Probablement d'origine africaine, la maladie aurait suivi les migrations humaines vers les côtes de la Méditerranée jusqu'en Inde et en Asie du Sud Est. Dans le passé, le paludisme était fréquent dans le marais Pontins autour de Rome et son nom était tiré de l'italien « mal-aria » ou « mauvais air » ; il était connu sous le nom de fièvre romaine.

Le paludisme pose aujourd'hui un problème de santé publique pour plus de 100 pays représentant un total de 2,4 milliards de personnes, soit environ 40% de la population mondiale. Ces pays sont essentiellement des pays en développement situés en Afrique, en Asie et en Amérique Latine. Tous les ans, on recense 300 à 500 millions de personnes contaminées et environ trois millions de morts, la plupart en Afrique dont environ **1 million sont des enfants de moins de 5 ans résidant en Afrique subsaharienne**. Le nombre de décès excède aisément celui du SIDA (Aris, 2000).

Cinq mille (5000) cas de paludisme ont été diagnostiqués en France en 1998. La France est le premier pays européen touché par le paludisme d'importation (plus de 7000 cas estimés en 2001 avec 10 à 20 cas de décès par an entre 1998 et 2001. 83% des cas à *P.falciparum* viennent de l'Afrique intertropicale surtout de la Côte d'Ivoire, du Sénégal, du Mali, du Cameroun, de Madagascar et des Comores) (Legros et al., 2002).

Le paludisme est une urgence compte tenu du risque imprévisible d'évolution rapide vers une forme grave des accès à *Plasmodium falciparum* (neuropaludisme).

4.1.1. Répartition géographique et émergence

L'Afrique est le continent le plus particulièrement touché par le paludisme. Le danger est quasi nul en Afrique du Nord, mais majeur en Afrique de l'Est, en Afrique subsaharienne et en Afrique équatoriale.

En Asie, le paludisme est absent des grandes villes et plutôt rare dans les plaines côtières. Le danger est majeur dans les zones rurales du Cambodge, de l'Indonésie, du Laos, de la Malaisie, des Philippines, de la Thaïlande, du Vietnam et en Chine dans le Yunnan et à Hainan.

Dans les Antilles, le paludisme sévit à Haïti et près de la frontière de la République dominicaine. En Amérique centrale, il existe quelques micro-zones, mais le risque est relativement faible.

En Amérique du Sud, le risque est faible dans les grandes villes, mais réel dans les zones rurales en Bolivie, en Colombie, en Équateur, au Pérou et au Venezuela, et majeur dans toute la zone amazonienne (OMS, 2005), (Figure 5).

Figure 7. Distribution du paludisme dans le monde (OMS, 2005) (orange : zone de transmission du paludisme ; vert : zone à risque limité ; jaune : pas de paludisme) et risques de transmission (A : transmission, généralement très faible, de *P. vivax*, ou *P. falciparum* chloroquino-sensible ; B : transmission, généralement peu importante, de paludisme sensible à l'association chloroquine (ou atovaquone) + proguan ; C : transmission, généralement élevée de palusdisme chloroquine-résistant).

Notons que les estimations sont le plus souvent difficiles du fait du manque de fiabilité des statistiques dans les différents pays concernés. En 2002, des chercheurs de la revue Nature estimaient à 515 millions le nombre de malades, soit deux fois plus que les estimations de l'OMS (Snow et al., 2005).

L'une des plus grandes difficultés de la lutte contre le paludisme à l'échelle mondiale tient à la propagation et à l'intensification de la résistance des parasites aux antipaludéens. Ces produits étant en nombre limité, il est de plus en plus difficile de mettre sur pied des politiques relatives à ces médicaments et de prendre en charge la maladie comme il le faudrait.

Dans les pays qui n'appartiennent pas à l'Afrique subsaharienne, les décès pour cause de paludisme se produisent principalement chez les personnes non immunes qui contractent une infection à *P. falciparum* dans des zones où il n'existe pas de possibilités de diagnostic et de traitement.

On signale désormais une résistance de *P. vivax* à la chloroquine en Indonésie (Irian Jaya), au Myanmar, en Papouasie-Nouvelle-Guinée et au Vanuatu. Il y a quelquefois également résistance croisée à l'amodiaquine.

Le paludisme urbain et périurbain est en progression en Asie méridionale et dans de nombreuses régions d'Afrique. Les conflits militaires et l'agitation sociale, conjugués à des modifications défavorables du milieu, sont en grande partie responsables de ces épidémies, car elles entraînent des déplacements vers les zones impaludées d'un grand nombre de réfugiés non protégés, non immuns et physiquement affaiblis. Ces mouvements de population entraînent à leur tour de nouvelles flambées de paludisme et rendent encore plus explosives des situations déjà favorables aux épidémies.

Tout aussi inquiétante est la réémergence du paludisme dans des régions dont il avait été éradiqué (par exemple en République démocratique populaire de Corée, en République de Corée et au Tadjikistan), ou sa progression dans des pays où il était considéré jusqu'ici comme pratiquement éradiqué (par exemple en Azerbaïdjan, dans le nord de l'Iraq et en Turquie). Les épidémies de paludisme qui se produisent actuellement dans la plupart de ces pays résultent d'une détérioration rapide des opérations de prévention et de lutte, dont les causes sont multiples.

Les effets économiques du paludisme sont particulièrement visibles dans les zones rurales où la maladie frappe souvent à une époque de l'année où l'agriculture a le plus grand besoin de main-d'œuvre. En outre, il est une cause habituelle d'absentéisme scolaire, qui peut parfois atteindre 28%. On estime que le coût direct et indirect du paludisme pour la seule Afrique dépasse 2 milliards de dollars des Etats-Unis (OMS, 2005).

4.1.2. Relation hôte- vecteur

Le vecteur est l'anophèle femelle de la famille des Anophélinés et du genre Culicidés. Les anophèles femelles se reconnaissent à leur position de repos oblique par rapport au support sur lequel ils sont posés et à leurs appendices céphaliques. Seule la femelle est hématophage et pique préférentiellement le soir et la nuit.

Quatre espèces plasmodiales peuvent être responsables de l'infection chez l'homme qui est le seul hôte réservoir : *Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae* et *Plasmodium falciparum.*

• *Plasmodium falciparum* : le plus répandu, à l'ensemble de la zone intertropicale. Son incubation est de 7 à 12 jours. Il est responsable de la fièvre tierce maligne, de l'accès

pernicieux. Il évolue d'une seule tenue, sans rechutes. Il est rare de voir survenir un accès à *Plasmodium falciparum* plus de deux mois après le départ d'une zone d'endémie.

• *Plasmodium vivax* possède une répartition large mais il est absent en Afrique noire. Il est responsable de la fièvre tierce bénigne. Sa durée d'incubation est variable (de 15 jours à plusieurs mois), il évolue avec des rechutes (accès de reviviscence).

• *Plasmodium ovale* est essentiellement retrouvé en Afrique noire, sa durée d'incubation est variable (15 jours à plusieurs années). Il est très proche de *P. vivax.*

• *Plasmodium malariae* présente une répartition plus clairsemée grossièrement superposable à celle de *P. falciparum*. Il est responsable de la fièvre quarte et d'accès.

Les parasites ont un cycle asexué chez l'homme et un cycle sexué chez l'anophèle femelle. Au cours de la piqûre, un moustique infecté injecte les formes infestantes qui gagnent rapidement le foie (cycle exo-érythrocytaire). Après une phase de multiplication, les parasites sont libérés dans la circulation sanguine et pénètrent dans les hématies (cycle intra-érythrocytaire). La succession de cycles érythrocytaires provoque les accès fébriles concommitants à la libération d'antigènes et à une hémolyse.

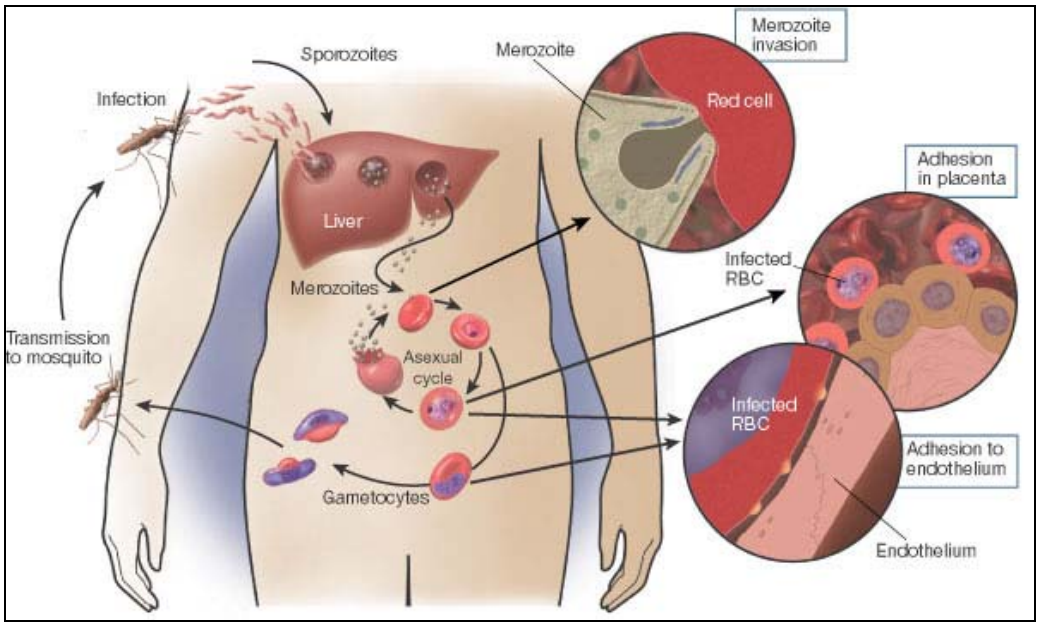


Figure 8. Cycle de vie du parasite et pathogénie du paludisme à *P. falciparum* (Miller et al., 2002). L'anophéle en piquant l'homme déverse dans la circulation sanguine les sporozoïtes qui vont directement se loger dans le foie où ils se multiplient et donner des formes âgées (les mérozoïtes) qui sont déversées dans le sang et coloniser les hématies.

4.1.3. Clinique

On distingue les accès de primo-invasion et les accès de la phase d'état à fièvre périodique. Le tableau clinique des accès de primo-invasion est celui d'un embarras gastrique fébrile associé à des céphalées et des myalgies. Une hépatomégalie peut parfois être retrouvée. Puis va succéder la phase d'état avec une périodicité des accès thermiques. Ces accès palustres sont caractérisés par la succession de 3 phases à rythme régulier : frissons, chaleur, sueur. Dans la réalité, les accès sont souvent moins typiques.

Les critères de gravité ont été définis en 1990 par l'OMS, mais en pratique quotidienne la définition du paludisme grave doit être plus large. Chez l'adulte non immun, il peut s'agir du neuropaludisme (accès pernicieux), mais un tableau d'état septique grave n'est pas rare.

Le neuropaludisme se caractérise par des troubles de la conscience (coma calme), des convulsions et des troubles neurologiques (troubles du tonus, troubles cérébelleux…).

La schizogonie profonde de *Plasmodium falciparum* est à l'origine de complications redoutables dont la malaria cérébrale. Celle-ci consiste en des thromboses capillaires responsables de lésions vasculaires et hémorragiques, provoquant des altérations dégénératives des cellules nerveuses, entourées d'infiltrats cellulaires.

Plusieurs théories sont en présence pour expliquer ces phénomènes :

- obstacles mécaniques sur la circulation micro-capillaire et veineuse à cause d'une déformabilité diminuée des érythrocytes parasités et de la formation de "rosettes" constituées d'un globule rouge parasité auquel adhèrent, par un mécanisme non élucidé (les antigènes et les immunoglobulines exposés à sa surface joueraient un rôle), des érythrocytes normaux; ces phénomènes causent une diminution du débit circulatoire et un coma métabolique réversible;
- adhérence immunologique de globules parasités à l'endothélium vasculaire post-capillaires causant des ralentissements circulatoires importants; cette adhérence serait sous la dépendance de certaines protéines de surface des globules parasités visibles au microscope électronique (protubérances ou "knobs"), des lymphocytes T CD4+, de certaines interleukines, en particulier du TNF, et de récepteurs endothéliaux du type ICAM-1.

Des manifestations viscérales peuvent être associées : splénomégalie, hépatomégalie, hypoglycémie, ictère, anémie, œdème aigu du poumon, collapsus, insuffisance rénale fonctionnelle et troubles de la coagulation. Ces accès graves non traités sont mortels, mais correctement traités la mortalité reste cependant élevée.

Le paludisme viscéral évolutif survient chez des sujets insuffisamment prémunis et exposés à des infestations répétées (enfants autochtones, adulte expatrié sous chimioprophylaxie insuffisamment efficace).

Il associe une anémie, une dyspnée, une splénomégalie, une fièvre modérée à 37.5°C avec des poussées intermittentes à 38 ou 38.5°C et un retard staturopondéral chez l'enfant. Biologiquement, on retrouve une anémie rarement brutale, profonde, une leuconeutropénie, un syndrome inflammatoire, une hypergammaglobulinémie avec une élévation surtout des IgG. L'identification directe est rarement positive, tandis que le sérodiagnostic décèle un taux élevé d'anticorps antipaludiques (Gentilini M, 1990 ; Malvy et al., 2000).

4.1.4. Diagnostic

Le diagnostic biologique du paludisme est une urgence.

L'anémie est facultative et dépend du stade évolutif de la maladie. Une leucopénie ou une leucocytose peuvent être observées. Une thrombopénie est souvent observée au cours du paludisme à *P. falciparum* (75% des cas), elle est beaucoup moins fréquente avec les autres espèces.

Aucun élément du tableau clinique du paludisme n'est spécifique de l'infection. Il est donc important de confirmer le diagnostic par la mise en évidence de ces hématozoaires. Le prélèvement doit être fait immédiatement sans attendre un frisson ou un pic thermique. Ce diagnostic repose sur la mise en évidence du parasite par l'examen microscopique d'un frottis de sang. Cette technique de référence permet d'établir un diagnostic d'espèce et d'évaluer la parasitémie. D'autres techniques plus rapides sont fréquemment associées au frottis mince : la goutte épaisse, ou des techniques plus récentes (QBC®, détection d'antigènes).

4.1.5. Traitement

La prise en charge ambulatoire est possible sous certaines conditions très strictes. Habituellement, les formes non compliquées relèvent d'une hospitalisation et d'une

surveillance d'une durée minimum de 24h. La constatation de signes de gravité impose l'orientation en réanimation. La quinine ou la méfloquine sont les médicaments à utiliser en première intention.

4.1.6. Paludisme et folates

Le paludisme dont le parasite le plus redoutable : le *Plasmodium falciparum* est un fléau mondialement reconnu avec près deux millions de mort par an et des résistances développées à tous les médicaments disponibles causant ainsi de lourds fardeaux socio-économiques aux pays des régions tropicales et subtropicales (Mutabingwa et al., 2001).

Au nombre des médicaments antipaludiques couramment utilisés les antifolates se sont révélés les meilleurs cibles moléculaires comme les enzymes dihydrofolate réductase (DHFR) et dihydroptéroate synthase (DHPS) qui participent à la voie métabolique des folates (Nzila, 2006).

Le métabolisme des folates est très important pour la viabilité des parasites du paludisme. Cette voie est ciblée pour le traitement et la prophylaxie des maladies depuis un demi-siècle et pour la découverte et l'introduction des médicaments antifolates pour combattre les infections bactériennes.

Les médicaments antipaludiques les plus répandus dans la gamme de : pyriméthamine (PYR), proguanil, sulfadoxine (SDX) et dapsone qui ont fourni une chimiothérapie que l'on peut se permettre dans les pays pauvres, ont pesé spécialement dans la résistance du principal antimalarique, la chloroquine, qui a inexorablement augmenté (Sibley et al., 2001).

Chez les autres organismes, les voies des cofacteurs des folates sont nécessaires à la production des purines et pyrimidines pour la réplication d'ADN aussi la synthèse et/ou le catabolisme des plusieurs acides aminés tels : méthionine, glycine, sérine, acide glutamique,

histidine. Par contre, le répertoire des réactions folate-dépendantes du parasite du paludisme n'est pas encore bien défini.

Plusieurs approches sont en principe possibles pour étudier la voie des folates, bien que des difficultés techniques dans la manipulation de parasites comme le *Plasmodium falciparum* demeurent encore un important facteur dans les conceptions expérimentales (Walliker et al., 1987).

4.1.7. SAHH (S-Adénosyl-L-homocystéine hydrolase) et paludisme

L'émergence de la pression sur la résistance du parasite du paludisme aux médicaments conventionnels a stimulé la recherche sur les anti-palustres qui présentent un nouveau mode d'action.

La SAHH est un régulateur de la méthylation. Les inhibiteurs de la SAHH affectent le statut de la méthylation de l'ADN, des protéines et autres molécules. Les inhibiteurs du Plasmodium falciparum (*Pf*SAHH) sont attendus pour fournir un nouveau type d'agents chimiothérapeutiques contre le paludisme. Vu le besoin pressant de développer des inhibiteurs sélectifs comme agents thérapeutiques, seules les structures SAHH humaines sont actuellement disponibles.

La SAM est le donneur de groupe méthyl le plus largement utilisé. Nombreuses méthyl-transférases transfèrent le groupe méthyl SAM à leurs accepteurs biologiques respectifs, formant la SAH (S-Adénosyl-L-Hcy). La SAH est hydrolysée par la SAHH pour donner l'Adénosine et la L-Hcy. L'inhibition de la SAHH résulte d'une accumulation de la SAH, un inhibiteur potentiel de la SAH-dépendante de la méthylation comme la modification en 5' terminal du RNA messager (mRNA) de l'eucaryote pour former une « cape structure ». Un

nombre d'inhibiteurs de la SAHH est choisi pour prévenir la prolifération virale et tumorale (Chiang, 1998).

La Néplanocine (NépA), un inhibiteur potentiel de la SAHH, est rapportée pour être un inhibiteur de la croissance du *P. falciparum* dans les globules rouges infectés (Whaun et al, 1986). Ainsi, les inhibiteurs de la SAHH sont attendus pour former un nouveau type d'agents chimiothérapeutiques contre le paludisme ; cependant, la NépoA et ses composés se sont montrés cytotoxiques dans les cellules humaines (Chiang, 1998) .

Nobutada et al., 2004 ont travaillé sur la structure cristalline de la SAHH du *Plasmodium falciparum* (*Pf* SAHH) et le produit de la réaction : l'Adénosine (Ado).

La connaissance de la structure du complexe Ado dans la combinaison avec une comparaison structurale de la SAHH humaine (*Hs*SAHH) révèle qu'une substitution unique entre la *Pf* SAHH en Cys59 et Thr60 de la *Hs*SAHH est prise en compte dans les interactions différentielles avec les inhibiteurs du nucléoside. Pour examiner le rôle du Cys59 dans les interactions avec les inhibiteurs du nucléoside, un mutant *Pf*SAHH a été préparé. Un remplacement de Cys59 par Thr résulte du mutant P*f*SAHH qui montre la sensibilité de l'inhibiteur de *Hs*SAHH. La présente structure semble fournir les opportunités du choix potentiel sélectif des inhibiteurs de *Pf*SAHH.

4.1.8. MTHFR et paludisme

Le Plasmodium falciparum utilise la voie des polyamines, essentielle dans la prolifération et la différenciation et impose un stress oxydant à la cellule hôte accroissant ainsi la perte du glutathion.

Chillemi et al. 2004 ont examiné les enfants africains du Burkina Faso souffrant du paludisme grave défini par les critères de l'OMS et ont conclu une association entre la gravité du

paludisme et le métabolisme de l'Hcy. L'élévation du taux de l'Hcy serait corrélée positivement avec la gravité du paludisme et le nombre de parasites, mais négativement avec le taux de l'Hb et l'âge.

L'élévation du taux de l'Hcy en rapport avec la mutation de l'allèle *677T MTHFR* semble suggérer un autre mécanisme pour la sélection de cet allèle muté. La prévalence de cette mutation est de l'ordre de 6 à 7% au Burkina Faso (Sadewa et al., 2002 ; Botto et al., 2000). Dans les autres régions du monde, cette prévalence peut atteindre 35 à 45% (Shaw et al., 1998 ; Pallaud et al., 2001). Cette différence entre les pays développés et ceux en voie de développement serait attribuée à la déficience du taux de l'Hcy (Esfahani et al., 2003).

Chez les sujets hétérozygotes la présence du *Plasmodium falciparum* montrait une augmentation de l'Hcy. Considérant que le parasite se multiplie dans les globules rouges de l'hôte grâce à l'Hcy, le taux élevé de l'Hcy pourrait interférer positivement le métabolisme du parasite. Dans cette condition, la réaction inverse de la SAHH du *Plasmodium* ne détermine pas l'augmentation de la SAH qui inhiberait le métabolisme du parasite, car l'activité de la SAHH chez le *Plasmodium* est 21 fois plus faible que celle de la cellule humaine (Nakanishi et al., 2001). Par conséquent, l'hétérozygote C677T avec un taux élevé serait très désavantageux par la présence du *Plasmodium falciparum* ; au contraire, l'allèle sauvage C677C du MTHFR jouerait un rôle protecteur contre le paludisme (Simpore et al., 2000).

Les résultats suggèrent qu'au cours du paludisme à *Plasmodium falciparum*, le dosage plasmatique de l'Hcy pouvait être introduit comme un paramètre prédictif de la sévérité et aussi dans l'efficacité du traitement. Cependant, cette stratégie du traitement est concevable dans les pays développés. L'introduction du dosage de l'Hcy comme marqueur du pronostic du paludisme dans les pays au Sud du Sahara est une utopie face à la situation socioéconomique de ces pays.

4.1.9. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants dans lequel les premiers sont élevés (Mylonas et al., 1999 ; Levander et al., 1993). Les ROS sont les importants pro-oxydants. La production des ROS pendant l'infection malariale s'opère à travers deux mécanismes :

- Le premier nécessite la dégradation de l'hémoglobine par le parasite intracellulaire. De là le fer ferreux Fe^{2+} est oxydé pour former le fer ferrique Fe^{3+} après que l'hème soit séparé de la globine et les électrons produits pendant ce processus réagissent avec l'O_2 moléculaire pour former les ROS (Francis et al., 1997 ; Mohan et al., 1992).

- Le second mécanisme requiert l'activation de la réponse immunitaire de l'hôte qui résulte de la production des cytokines TNF-α et IFN-γ, et celles-ci augmentent leur taux respiratoire sur les phagocytes (Jayshree et al., 1992 ; Dockrell et al., 1984). De plus, l'accès palustre résulte de l'abaissement des enzymes antioxydantes et des substances comme la catalase, la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase (SOD), l'albumine, le glutathion, l'acide ascorbique et le tocophérol plasmatique (Erel et al., 1997 ; Thurnham et al., 1991).

La protection du stress oxydatif reflèterait la vulnérabilité du *Plasmodium* des ROS, cela a été confirmé *in vivo* après injection intraveineuse de l'H_2O_2 dans le *Plasmodium yoelli* et le *Plasmodium chabaudi* infectant les souris et après *in vitro* tuant ces parasites par l'H_2O_2 (Dockrell et al., 1984). L'administration des pro-oxydants comme l'alloxan ou le t-butylhydroperoxyde inhibe le développement du parasite *in vivo* et *in vitro* (Clark et al., 1984). De plus, les caractéristiques génétiques de l'hôte peuvent accroître la susceptibilité des globules rouges pour produire les ROS, ceci induit la déficience de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PD), les thalassémies et les hématies falciformes ; toutes ces conditions sont partiellement protégées du paludisme à *Plasmodium falciparum* (Senok et al., 1997).

Depuis que les ROS produites durant l'accès palustre sont corrélées avec le neuropaludisme, la recherche s'est concentrée sur l'interaction du TNF-α et les autres cytokines et leurs effets sur la production des ROS en peroxydase des cellules membranaires et la production de l'œdème cérébral après l'effondrement de la perméabilité vasculaire (Postma et al., 1996).

4.1.10. TNF alpha et paludisme

La pathogenèse de la malaria cérébrale (neuropaludisme) reste encore mal comprise. Dans cette affection, la séquestration des hématies est plus importante dans le cerveau; ce qui peut expliquer que le coma soit un aspect si fréquent. Trois théories pathogéniques ont été proposées pour le neuropaludisme humain : la théorie de la perméabilité, la théorie mécanique et la théorie immunologique. Il semble qu'une combinaison de facteurs dépendants à la fois de l'hôte et du parasite contribue à la pathologie des crises aiguës à *P. falciparum* et plus spécialement à la sévérité des lésions au niveau cérébral.

L'étude des mécanismes physiopathologiques étant complexe chez l'homme, l'équipe du Professeur Jürg Gysin de l'Unité de Parasitologie Expérimentale de la Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée à Marseilles a initié un modèle expérimental de malaria cérébrale chez la souris avec une modélisation *in vitro* de la malaria cérébrale humaine, en utilisant des cultures de cellules humaines.

Les recherches dans le modèle expérimental murin de malaria cérébrale ont indiqué que les complications cérébrales dépendent d'une stimulation inappropriée sur le système immunitaire chez l'hôte infecté. L'atteinte neurologique et la mortalité associée ne surviennent que chez l'animal susceptible possédant des lymphocytes T intacts; une des conséquences de l'activation des cellules T est la production de divers médiateurs de l'inflammation. Parmi

ceux-ci, il a été trouvé une cytokine, le facteur nécrosant des tumeurs ("*tumour necrosis factor", TNF*) qui jouerait un rôle important dans la pathogenèse de la malaria cérébrale.

Au cours des dernières années, l'attention a été focalisée sur les mécanismes responsables de la production excessive de TNF et sur les mécanismes effecteurs de la toxicité vasculaire du TNF.

Les résultats indiquent que la susceptibilité aux lésions neurovasculaires de la malaria est associée à une capacité élevée de produire de l'IFN-γ en réponse aux antigènes malariques. Comme la production de cytokines définit les sous-classes de lymphocytes T CD4+, appelées Th1 et Th2, ces données suggèrent que contrairement à d'autres maladies parasitaires, la malaria cérébrale implique une expansion prédominante des lymphocytes Th1.

L'utilisation d'un panel d'anticorps monoclonaux comme traitement *in vivo* de souris impaludées a montré que seuls les anticorps dirigés contre la molécule "leucocyte function adhesion molecule 1" (LFA-1) préviennent les complications cérébrales et la mortalité aiguë. Comme cet anticorps s'est avéré efficace même lorsqu'il est administré quelques minutes avant la mort des souris, les propriétés immunosuppressives connues de l'anti-LFA-1 ne peuvent être invoquées. Les mécanismes d'action de cet anticorps ont été réévalués. C'est pourquoi il a été envisagé le rôle possible des plaquettes dans la pathogenèse de la malaria cérébrale.

Le rôle clé des plaquettes dans le développement des lésions neurologiques de la malaria cérébrale a été démontré chez la souris. La fusion de plaquettes à l'endothélium a été décrite *in vitro* et *in vivo* comme un processus physiologique assurant la trophicité des cellules endothéliales. Dans la malaria sévère, ce processus pourrait être accentué et participer à la lésion endothéliale. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives quant aux mécanismes d'action de l'anticorps anti-LFA-1 *in vivo* : l'interférence avec les effets délétères des interactions plaquettes-endothélium. Outre la malaria cérébrale, un traitement *in vivo* par

anticorps anti-intégrine confère une protection significative dans diverses pathologies. Le rôle effecteur des plaquettes dans les atteintes microvasculaires pourrait conduire à de nouvelles approches thérapeutiques dans les lésions induites par le TNF au sens large.

4.1.11. Dérivés de la vitamine B12 et Paludisme

L'acquisition de la résistance par le parasite aux antipaludiques existants a suscité le développement de nouveaux agents chimiothérapeutiques. L'effet des dérivés de la vitamine B12 sur la formation de la b-hématine (hématozoïne) est déterminé dans les conditions similaires à celles du contenu de la vacuole du parasite utilisant la chloroquine, l'inhibiteur connu de la formation de l'hématozoïne.

L'hémoglobine est ingérée par le parasite au moyen des cytosomes qui étirent le cytoplasme érythrocytaire et les délivrent au contenu de la vacuole par le transport des vésicules (Rosenthal et al., 1998 ; Olliaro et al., 1995). Dans la vacuole, l'hémoglobine est digérée par les enzymes protéolytiques pour donner 4 équivalents de l'hème ou du Fe(III) protoporphine-IX ; ainsi que des peptides. Les peptides sont aussi digérés en acides aminés (Rosenthal et al., 1998 ; Olliaro et al., 1995), une petite portion est utilisée par le parasite (Krugliak et al., 2002). L'hème est oxydée en hématine qui lyse la membrane du parasite, conduisant à la mort cellulaire. Dans *le P. falciparum*, l'hème toxique est détoxifiée par conversion à l'hématozoïne (à peu près 95%) (Egan et al., 2002).

L'hématozoïne apparaît très tôt pendant le stade trophozoïte du parasite (Olliaro et al., 1995) et est présente en grandes quantités, comme les particules microcristallines, dans la vacuole. Ainsi, le parasite détoxifie l'hème par précipitation de l'hématozoïne qui lui est inoffensive.

La chloroquine et les autres quinolones antiamarils (comme la quinine) sont de faibles bases lipophiles et, dans leur forme inactive, diffusent facilement à travers la membrane vacuolaire.

Cependant, puis que la membrane vacuolaire n'est pas perméable à la forme protonique, les quinolones s'accumulent dans l'environnement acide de la vacuole. La chloroquine et la quinine agissent par retardement du débit de la formation de l'hématozoïne (Egan, 2003 ; Tekwani et al., 2005) dans la vacuole permettant ainsi l'accumulation de l'hématine toxique qui lyse et tue les parasites de la malaria (Egan, 2003). Malheureusement, le *Plasmodium falciparum* a développé une résistance à la chloroquine et aux autres quinolones antiamarils. La résistance à la chloroquine est associée aux mutations dans le gène codant pour le *Pf*CRT (transport des protéines dans la vacuole), résultant de la rapide exportation de la chloroquine de la vacuole du parasite avant qu'elle puisse exercer son effet toxique (Warhurst, 2001 ; Wellems, 2002). Cependant, le parasite du paludisme n'a pas un contrôle génétique sur la formation de l'hématozoïne et ce processus n'est pas assujetti à la pression médicamenteuse (Wellems, 2002). En conséquence, les composés non apparentés à la chloroquine, mais qui inhibent la formation de l'hématozoïne ont un potentiel antiamaril.

Les dérivés de la vitamine B12 qui seraient capables d'inhiber la formation de l'hématozoïne et capables d'exercer un potentiel antiamaril ont été envisagés. Pour déterminer leur effet sur la formation de l'hématozoïne, les dérivés de la vitamine B12 comme Ado-Cbl, CH_3-Cbl, H_2O-Cbl, CN-Cbl et dicyanocobalamine ont été testés in vitro pour voir leur effet sur la croissance du *Plasmodium falciparum*. L'avantage majeur des cobalamines est qu'ils ne sont pas toxiques à l'organisme humain, même à des doses élevées allant jusqu'à 6 mg par jour sur 8 semaines (Takahashi et al., 1999) ; cela est bien toléré. Dans le plasma humain, les cobalamines sont très liés au transport de la Transcobalamine-II ; les liaisons Transcobalamine-II/cobalamines ont lieu dans le cytoplasme des globules rouges par des récepteurs médiateurs de l'endocytose. Une fois le complexe formé, la Transcobalamine-II est dégradée dans le lysosome et la cobalamine est libérée (Seetharam, 1999 ; Babior et al., 2005). La cobalamine libérée est transportée dans le cytoplasme, réduite en Transcobalamine-

II et est convertie en CH_3-Cbl dans le cytoplasme ou en Ado-Cbl dans la mitochondrie (Yamanishi et al., 2005). Comme les globules rouges se développent à partir du stage nucléé précurseur (la moelle osseuse) en réticulocytes et en érythrocytes matures ils perdent leur capacité à incorporer la transcobalamine-II liée au CH_3-Cbl (Retief et al., 1966).

L'infection à *P. falciparum* est reconnue médier la réactivation endogène des transporteurs de globules rouges et augmenter la perméabilité de la membrane érythrocytaire (Ginsburg et al., 2005). Aussi, les concentrations utilisées pour inhiber la croissance du parasite (concentrations supraphysiologiques) pouvaient être acceptées par les érythrocytes par simple diffusion indépendante des sites récepteurs (Retief et al., 1966). Toutefois, le mécanisme mis en évidence ne tient pas compte du transport; le parasite est capable d'incorporer de grosses molécules telles que les protéines globulaires : la rhodamine A, la transferrine et autres dans le cytoplasme. La voie non sélective par laquelle ces molécules sont incorporées dans le parasite peut être utilisée par le parasite pour absorber la cobalamine encore liée à la transcobalamine-II ou à l'haptocorrine. Une fois incorporées dans la vacuole parasitaire, ces protéines sont susceptibles d'être digérées par les enzymes protéolytiques (Rosenthal et al., 1998 ; Olliaro et al., 1995).

Les dérivés des cobalamines tels l'Adénosyltranscobalamine (Ado-Cbl), la méthyltranscobalamine (CH_3-Cbl) et l'aquacobalamine (H_2O-Cbl) sont approximativement 4 fois plus inhibiteurs efficaces de la formation de la b-hématine que la chloroquine ; la cyanocobalamine (CN-Cbl) est légèrement plus inhibiteur que la chloroquine alors que la diacynocobalamine n'a aucun effet. Ado-Cbl, CH_3-Cbl et CN-Cbl ne s'accumulent pas dans la vacuole du parasite.

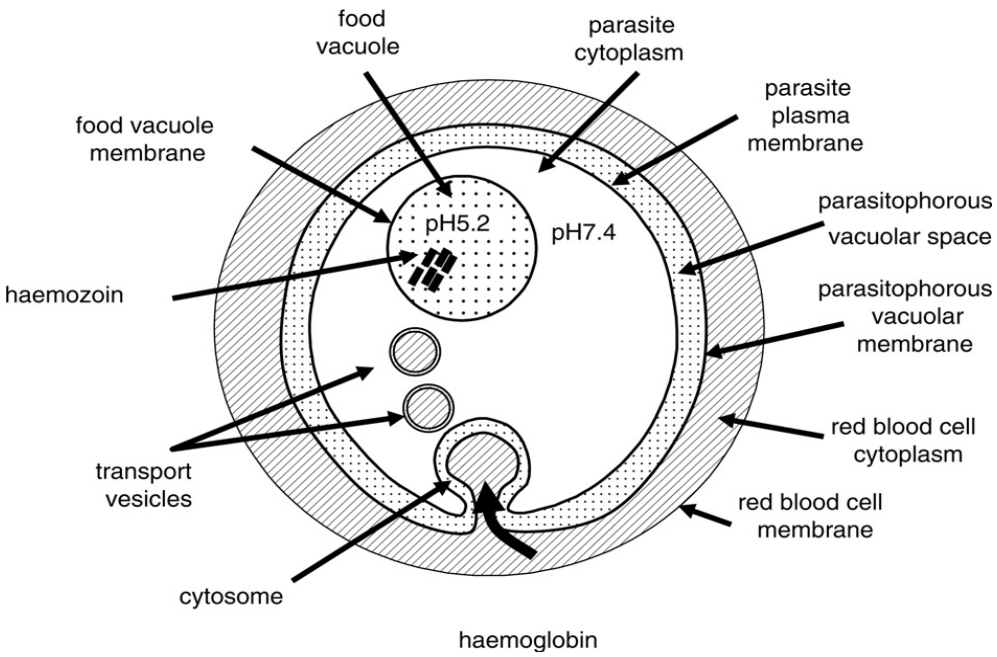


Figure 9. Diagramme d'un globule rouge contenant un trophozoïte montrant le transport de l'hémoglobine dans la vacuole où elle est digérée (Chemaly et al., 2007).

4.2. L'obésité et le syndrome métabolique

Les maladies cardiovasculaires représentent l'une des premières causes de morbi-mortalité dans le monde. Leur prévalence en milieu hospitalier africain varie entre 7,7 et 24% chez l'adulte. Avec le développement, les populations en Afrique au sud du Sahara adoptent de nouveaux modes de vie dits « occidentaux ». Ceci explique en partie l'émergence dans cette région des maladies cardiovasculaires qui rentrent dans le cadre des maladies non transmissibles (MNT) (Lombard et al., 2002).

Selon le rapport sur la santé dans le monde 2002, les maladies cardiovasculaires ont représenté 9,2% de l'ensemble des décès dans la région africaine en l'an 2000 (contre 8,15% en 1990) (Decision 179, Control of arterial hypertension in Africa, Addis Abéba, Organisation de l'Unité africaine, 2002).

Les maladies cardiovasculaires ont également de graves répercussions socio-économiques en termes de coût de soins de santé, d'absentéisme, de productivité nationale, sur les individus, les familles et les communautés (OMS, 2000).

L'une des principales étiologies des affections cardiovasculaires est l'athérosclérose. Le développement et la progression des plaques d'athérome sont favorisés par un ensemble de perturbations métaboliques que l'on désigne par syndrome métabolique (SM)**.**

Le syndrome métabolique ou syndrome d'insulino-résistance ou syndrome X est actuellement considéré comme un important facteur de risque cardiovasculaire. Le syndrome métabolique prédit le diabète et les maladies cardiovasculaires. En présence d'un syndrome métabolique, le risque de survenue d'un diabète non insulinodépendant est multiplié par trois. Il en est de même des accidents vasculaires cérébraux et de la mort subite. Or selon l'OMS, la prévalence du diabète augmentera de 170% dans les pays en développement d'ici l'an 2025.

4.2.1. Définition du syndrome métabolique

En 1988, Gérard Reaven, après les travaux préliminaires de Jean Vague (1957), a introduit le concept de syndrome X. Ce syndrome est actuellement appelé syndrome (pluri) métabolique ou syndrome d'insulinorésistance. Il regroupe différents facteurs connus de risque vasculaire.

De nombreuses données suggèrent qu'une accumulation excessive de tissu adipeux abdominal constitue un facteur de risque indépendant de MCV (Rexrode et al., 1998) et que les caractéristiques du syndrome métabolique résultent souvent d'un excès de adipocytes abdominale, spécialement lorsqu'il s'accompagne d'une accumulation importante de tissu adipeux viscéral (Pascot et al., 2001).

Il n'existe pas de définition universelle du syndrome métabolique ni de consensus réel autour des critères utilisés pour son diagnostic (Liao et al., 2004).

Après une démarche initiale de l'OMS en 1999 visant à définir le syndrome métabolique selon une approche physiopathologique qui reposait sur l'évaluation de marqueurs de résistance à l'insuline, le *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* en 2001 puis l'*International Diabetes Foundation* en 2005 ont proposé une approche plus clinique avec l'objectif d'identifier dans un but de médecine préventive les patients concernés et donc à risque de développer un diabète de type 2 et des maladies cardio-vasculaires. La notion de syndrome métabolique est ainsi construite autour d'anomalies du métabolisme des lipides et des hydrates de carbone, d'une élévation de la tension artérielle, et d'une obésité viscérale de localisation abdominale. Ces paramètres ne rendent cependant pas totalement compte des mécanismes conduisant au développement du SM. La physiopathologie du SM est encore aujourd'hui partiellement comprise. Elle résulte vraisemblablement de la combinaison de facteurs environnementaux, génétiques et épigénétiques. L'obésité viscérale abdominale, un état d'inflammation chronique de bas grade et un état de résistance à l'insuline sont les principaux processus susceptibles d'expliquer les différentes composantes de ce syndrome (Jullien, 2008).

L'obésité abdominale est le facteur clé de ce syndrome. Certains auteurs y associent une dysfonction endothéliale, une hyper-uricémie, une hypertrophie du ventricule gauche, une stéatose hépatique non alcoolique NASH (non alcoholic steatohepatitis) qui peut évoluer vers la fibrose et la cirrhose.

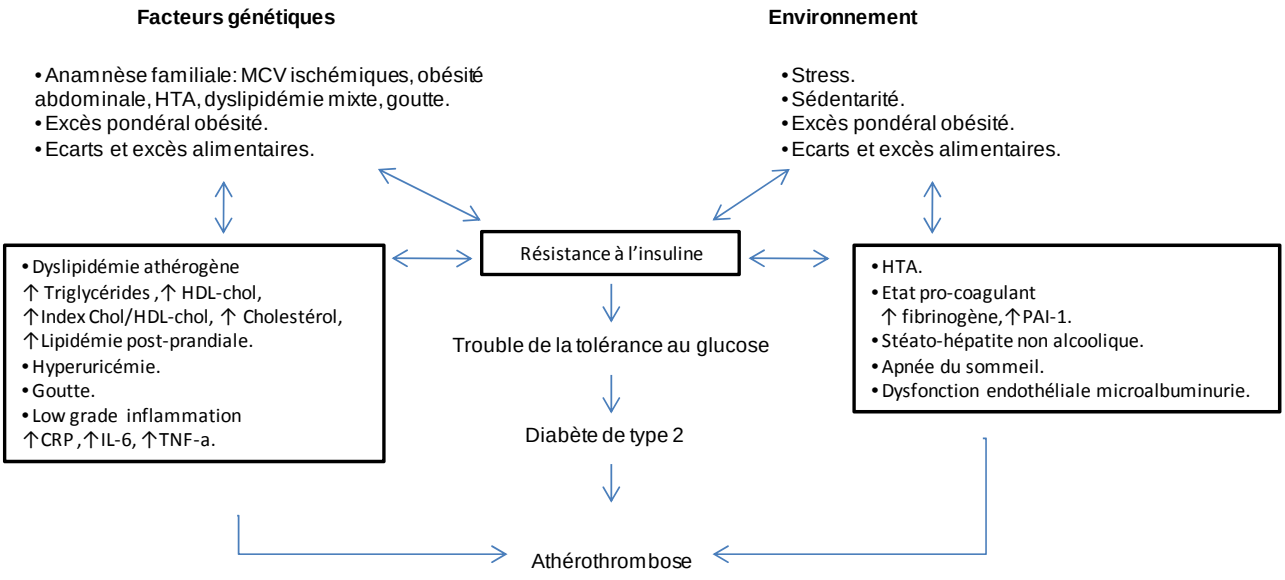


Tableau 3. Ensemble des facteurs de risque associés au syndrome métabolique. (Darioli et al., 2003)

4.2.2. Nouvelle définition « mondiale » du SM.

Selon la Fédération Internationale de Diabète (IDF), le SM est responsable des deux plus grandes épidémies mondiales, soit les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2. La prévalence du SM est d'environ 25 % de la population. Comparativement à la population normale, les gens atteints du SM ont un risque 3 fois plus élevé de subir un infarctus ou un accident vasculaire cérébral et un risque 2 fois plus élevé d'en mourir. De plus, près de 200 millions de personnes souffrant du diabète et 80 % des diabétiques vont mourir d'une maladie cardiovasculaire. Ces données ahurissantes font en sorte que nous avons des obligations morales, médicales et économiques qui justifient le dépistage précoce et le traitement intensif du SM afin de prévenir le développement du diabète et des maladies cardiovasculaires.

Plusieurs définitions du SM ont été proposées par différentes organisations comme l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO), *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP ATPIII), *European Group for the Study of Insulin Resistance*

(EGIR), *American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE) (Annales de Biologie Clinique du Québec, 2005).

Cette diversité de définitions entraîne une certaine confusion. Afin de se donner un outil de diagnostic universel et facilement applicable en clinique, l'IDF a proposé une nouvelle définition « mondiale » du SM (Tableau 3).

CRITÈRES	**LIMITES**
Circonférence abdominale selon les ethnies *	
Descendance européenne :	
Hommes	≥ 94 cm
Femmes	≥ 80 cm
Triglycérides	≥ 1,70 mmol/L ou 1,50 g/L
HDL-Cholestérol	
Hommes	< 1,04 mmol/L ou 0,40g/L
Femmes	< 1,29 mmol/L ou 0,50 g/L
Pression artérielle	≥ 130/85 mm Hg
Glycémie**	≥ 5,6 mmol/L ou 1,10 g/L

Tableau 4. Syndrome métabolique selon l'IDF (3 critères sur 5 sont nécessaires pour le diagnostic).

* Définition du SM selon le NCEP ATP III : circonférence abdominale ne varie pas selon les ethnies et est ≥102 cm chez les hommes et ≥ 88 cm chez les femmes.
** Définition du SM selon le NCEP ATP III : glycémie ≥ 6,1 mmol/L.

4.2.3. Obésité

L'obésité est un état caractérisé par un excès de masse grasse répartie de façon généralisée dans les diverses zones de l'organisme. L'obésité peut être simplement définie comme une maladie au cours de laquelle un excédent de masse grasse s'est accumulé jusqu'à avoir des effets indésirables sur la santé. Toutefois, la quantité des adipocytes en excès, sa répartition

dans l'organisme et la morbidité qui lui est associée, varient considérablement d'un individu obèse à l'autre.

4.2.4. Classification et épidémiologie de l'obésité

La classification du surpoids et de l'obésité permet :

- d'effectuer des comparaisons significatives du poids au sein d'une population et d'une population à l'autre
- d'identifier les sujets et les groupes à risque accru de morbidité et de mortalité
- de déterminer les interventions prioritaires au niveau individuel et communautaire
- de disposer d'une base solide pour évaluer les interventions

L'embonpoint et l'obésité contribuent au diabète de type 2, à l'hypertension artérielle et à certains cancers (Gilmore, 1999), en plus d'être des facteurs de risque des maladies du cœur et de l'accident vasculaire cérébral.

Deux méthodes sont couramment employées pour évaluer l'embonpoint et l'obésité. L'une des méthodes est l'indice de masse corporelle (IMC). On calcule l'IMC en divisant le poids (exprimé en kilogrammes) par le carré de la taille (exprimée en mètres). Autrement dit, la formule de Quételet donne :

$$IMC = Poids\ (kg) \ / \ Taille^2\ (m^2)$$

IMC (Catégorie)	Classe d'IMC (kg/m²)
Insuffisant	<18.5
Normal	18.5-24.9
Embonpoint	25.0-29.9
Obèse	>30.0

Un IMC (kg/m2) entre 25 et 29,9 est considéré comme un signe d'embonpoint. Un IMC de 30 ou plus est un indicateur d'obésité. Dans le cas de certaines personnes ayant une masse musculaire importante, l'IMC ne reflète peut être pas correctement la corpulence (Santé Canada. Lignes directrices pour la classification du poids chez les adultes, Catalogue H49-179, Ottawa, Santé Canada, 2003).

L'autre manière d'évaluer l'obésité est de mesurer le tour de taille. Le fait d'avoir un excès de poids dans la région abdominale est associé à un risque accru de maladie du cœur et d'accident vasculaire cérébral, d'hypercholestérolémie, de diabète de type 2 et d'hypertension artérielle. Le tour de taille permet de mesurer la quantité d'adipocytes stockées au niveau de la taille. L'homme dont le tour de taille est de 102 cm ou plus et la femme dont le tour de taille est de 88 cm ou plus sont exposés à un risque plus élevé de diabète, d'hypertension artérielle, de maladie du cœur ou d'accident vasculaire cérébral. En effet, le risque de voir apparaître ces problèmes de santé est proportionnel au tour de taille (Santé Canada. Lignes directrices pour la classification du poids chez les adultes, Catalogue H49-179, Ottawa, Santé Canada, 2003).

Ces deux méthodes permettent de distinguer deux types d'obésité :

- **L'obésité gynoïde** caractérise le morphotype féminin. Les adipocytes prédominent au niveau de la partie inférieure du corps (zones glutéales, fémorales). Les personnes présentant une telle morphologie (souvent qualifiées de « poires ») sont plus exposées à des complications mécaniques.
- **l'obésité androïde** caractérise le morphotype masculin. Les adipocytes prédominent au niveau de l'abdomen et du tronc. Les personnes qui présentent ce type d'adiposité sont qualifiées de « pomme ». L'adiposité androïde est maintenant reconnue comme un important facteur de risque cardiovasculaire (Poulliot et al., 1994).

La prévalence de l'obésité est en constante augmentation dans le monde. Elle est actuellement considérée comme une épidémie, parfois dénommée « globésité ».

On estime que l'obésité frappe 18 % de la population mondiale, et a augmenté de 50 % ces sept dernières années. Depuis dix ans, la prévalence de l'obésité a augmenté de 10 à 40 % dans la majorité des pays européens. L'augmentation la plus spectaculaire concerne le Royaume-Uni, où elle a pratiquement doublé entre 1980 et 1995, passant de 6 à 15 % chez les hommes et de 8 à 17 % chez les femmes. Aux niveaux national et international, le nombre croissant d'enfants souffrant d'excès de poids ou d'obésité pose véritablement un problème : ces enfants connaissent en effet un risque accru de souffrir, à l'âge adulte, de maladies cardiovasculaires, d'hypertension et de diabète. L'obésité chez les écoliers avoisine les 10 %, et ce, non seulement dans des pays industrialisés comme les Etats-Unis, le Japon et quelques pays d'Europe, mais aussi dans des pays en voie d'industrialisation rapide tels que l'Algérie, l'Argentine, le Chili, l'Egypte, l'Indonésie, l'Iran, le Kiribati, le Maroc, le Pérou, l'Afrique du Sud, la Thaïlande et de nombreux pays de la zone Caraïbe (OMS, 2003).

D'après N'Diaye, (2007), ces prévalences rapportées par l'OMS sous-estiment probablement la fréquence réelle de l'obésité en Afrique, si on se réfère aux quelques publications rapportées.

Au Sénégal, dans une étude datée de 1986, il a été noté une obésité définie comme un surpoids supérieur ou égal à 10 % du poids idéal calculé selon la formule de Lorentz chez 36,6 % de consultants en médecine interne et chez 28 % de jeunes élèves infirmières (Sow et al., 1986).

Au Cameroun, 37 % des femmes travaillant dans les hôtels de Yaoundé sont étiquetées obèses dans une étude récente (Etoundi et al., 2006) et 33 % des femmes en milieu rural (Etoundi et al., 2001).

A l'île Maurice, une étude rapporte une augmentation spectaculaire de la prévalence de l'obésité en cinq ans : la proportion des hommes obèses est passée de 3,4 % en 1987 à 5,3 % en 1992 et celle des femmes de 10,4 à 15,2 % dans le même temps ; cette augmentation est observée dans toutes les classes d'âge et dans tous les groupes ethniques (OMS, 2003).

Aux USA on estime que l'obésité est responsable de 300.000 décès par an ; en France la proportion des personnes en surpoids et des personnes obèses était de 41,6 % en 2003 (enquête OBEPI). Au Bénin, une enquête transversale menée sur un échantillon de 220 individus à Cotonou, révèle une prévalence de l'obésité de 16,8% des personnes âgées de 21 à 45ans qui prédomine entre 35 et 45ans (Acakpo et al., 2000). Une autre menée en 2008 à Cotonou estime la prévalence de l'obésité à 18% (Sodjinou et al., 2008) au niveau des femmes.

L'obésité chez les jeunes hommes était associée à une augmentation des stries lipidiques et à des lésions plus complexes dans la coronaire droite. En outre, on notait la présence plus fréquente d'athérosclérose microscopique dans la coronaire descendante antérieure des individus obèses. Les sujets de race noire présentaient des lésions plus extensives que les sujets de race blanche et les hommes montraient également des lésions plus avancées que les femmes (Zieske et al., 2002).

4.2.5. Physiopathologie de l'obésité

L'obésité apparaît à la suite d'un déséquilibre chronique au profit des apports caloriques par rapport aux dépenses énergétiques. L'excédent d'énergie résultant de ce déséquilibre est stocké sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux.

L'état morbide fait donc suite soit à :

- une augmentation de l'apport calorique

- une diminution de la dépense d'énergie
- une combinaison des deux mécanismes précédents.

Dans tous les cas la conséquence est un bilan énergétique positif.

La dépense énergétique totale est le coût énergétique nécessaire à la réalisation des grandes fonctions de l'organisme (croissance, développement, reproduction, respiration, circulation…). La dépense énergétique des 24 heures se répartit en trois postes d'inégales importances :

- Le métabolisme de base qui correspond à la dépense énergétique minimale pour le fonctionnement et l'entretien de l'organisme dans les conditions standard.
- La dépense énergétique liée à l'activité physique. Elle varie en fonction de la nature, de la durée, et de l'intensité de l'exercice. Il est évident qu'elle est moindre en cas de sédentarité.
- L'effet thermique des aliments qui est le coût énergétique nécessaire à la transformation et au stockage des nutriments.

La dépense énergétique et le métabolisme de repos varient proportionnellement au poids, à la taille et à la masse maigre. D'autres facteurs tels que l'âge, le sexe, la génétique les influencent également.

L'étiologie de l'obésité est donc multifactorielle. Elle dépend de l'environnement (augmentation de la consommation de calories, réduction des dépenses liées à l'activité physique), mais aussi de la génétique (gènes régulant la lipolyse, la satiété).

Plusieurs travaux ont prouvé que la consommation spontanée de calories particulièrement sous forme de lipides est très augmentée chez l'obèse. Par contre, la dépense énergétique est caractérisée par un déficit de la thermogenèse et une réduction de la dépense liée à l'activité physique ; mais il existe une augmentation du métabolisme de base (Jullien, 2008).

Le métabolisme énergétique intègre de façon très étroite les trois classes métaboliques (glucides, lipides, protéines). Il est soumis à un contrôle hormonal strict qui peut se résumer à deux systèmes antagonistes :

- Le premier, responsable de la mobilisation et de la dépense des réserves fait intervenir : le cortisol, le glucagon, l'hormone somatotrope, les thyronines, les catécholamines.
- Le second est celui de la mise en réserve et de l'acquittement des dettes métaboliques. Il ne comprend que la seule insuline.

4.2.6. Complications de l'obésité

Les complications les plus couramment observées en cas d'obésité sont :

- les affections cardio-vasculaires (hypertension artérielle, infarctus du myocarde, varices, oedèmes)
- les affections ostéo-articulaires
- les gastropathies
- les complications respiratoires (dyspnée sine materia, apnées du sommeil)
- les complications métaboliques (diabète type 2, hyperlipidémie, hyper-uricémie)
- les complications psychologiques
- les infections cutanées et les cellulites.

En dehors de ces problèmes médicaux objectifs, l'obésité a également des aspects socioculturels qui diffèrent suivant les zones géographiques.

4.2.7. Approche sociologique de l'obésité

L’approche sociologique de l’obésité n’est pas la même selon que l’on se trouve dans une société occidentale, asiatique ou dans une société africaine.

- Dans les sociétés occidentales

  Selon le sociologue Jean-Pierre POULAIN, deux axes de recherche peuvent être empruntés dans la compréhension de l’obésité dans les sociétés occidentales.

  • Le premier axe postule que les statuts économiques sont la cause de l’obésité.

  La position sociale et les modes de vie influenceraient l’accès à la nourriture et à l’exercice physique. Dans les sociétés modernes, les dépenses énergétiques des individus ont considérablement baissé. Les causes en sont le chauffage, la climatisation des locaux, le développement des moyens de transport collectifs et individuels, la diminution de l’activité physique liée au travail professionnel. Parallèlement, les consommations alimentaires ont légèrement diminuées. Mais cette baisse s’est opérée de façon socialement diversifiée. Les classes populaires valorisent ″l’énergétique″, ″le puissant″ et donc consomment plus d’aliments énergétiques. Cette valorisation peut être comprise comme une « revanche sociale contre la faim ».

  Par ailleurs soumis au modèle esthétique de minceur, les hommes et plus encore les femmes des couches sociales moyennes et supérieures, pratiquent du sport et de l’exercice d’entretien. Ce n’est pas le cas dans les autres couches sociales.

  Tous ces facteurs expliquent que l’obésité des adultes se distribue sur le bas de l’échelle sociale.

  • Le deuxième axe postule que l’obésité détermine les trajectoires sociales (c’est-à-dire les statuts économiques).

L'obèse dans les sociétés occidentales souffre de stigmatisation. L'accès à l'enseignement supérieur ou à l'emploi, le niveau des revenus, la promotion professionnelle sont affectés par l'obésité.

L'obésité influe sur la mobilité sociale des individus, en particulier celle des femmes. L'obésité ralentit par exemple la mobilité intra- générationnelle et augmente la fréquence de la mobilité inter- générationnelle descendante. C'est ainsi que les femmes minces font plus fréquemment des mariages ascendants et qu'à l'inverse les femmes obèses réalisent plus souvent des mariages descendants.

- Dans les sociétés africaines

Les comportements vis-à-vis de l'obésité ne sont pas aussi tranchés. Il semble que coexistent le courant traditionaliste et un courant plus moderne qui rappelle certains aspects des théories occidentales.

En Afrique, les canons de beauté ne correspondent pas tout à fait à la « définition occidentale ». Particulièrement en Afrique noire, des femmes revendiquent leurs rondeurs. Ces dix dernières années, on a constaté l'explosion dans de nombreux pays (y compris le Bénin) du nombre de concours « de reine de beauté de femmes rondes ».

Il est à noter que dans la tradition africaine, l'obésité était perçue comme un signe d'aisance. Ainsi un homme qui a une femme ronde mérite des égards car cela signifie qu'il s'occupe bien de son foyer.

Le développement économique dans un contexte de mondialisation s'accompagne dans les pays d'Afrique d'une transition nutritionnelle et de mode de vie, marquée, particulièrement dans les villes, par des changements majeurs dans les systèmes alimentaires, changements liés

notamment à l'industrialisation de l'alimentation ; les villes sont exposées aux importations massives de produits alimentaires manufacturées, à la publicité et au marketing des groupes agroalimentaires, mais aussi à des changements importants et rapides des modes de vie : sédentarisation et diminution des activités physiques au quotidien, alimentation riche en énergie, en lipides et en sucres rapides, apparition et progression exponentielle de la restauration rapide « fast-food », des boissons gazeuses et de l'alcool. Tous ces facteurs, avec le tabac et le stress des villes, contribuent au développement rapide de ce que l'on appelle le « syndrome du nouveau monde » dont l'obésité constitue l'un des principaux symptômes avec le diabète, les dyslipidémies, l'hypertension artérielle, les maladies cardiovasculaires, le tabagisme et l'alcoolisme; ces maladies chroniques non transmissibles sont étroitement liées au processus de modernisation, d'acculturation et à une richesse croissante (N'Diaye, 2007).

Il commence à s'établir dans la conscience de la majorité des béninois des nouvelles générations, que l'obésité est bel et bien un facteur de risque de maladie. Paradoxalement les populations adoptent de plus en plus des attitudes (telle que la sédentarité) qui favorisent l'obésité ; la sédentarité pouvant se définir comme un manque de pratique de l'activité physique minimale répondant aux besoins de l'organisme humain. La sédentarité renforce toutes les causes de mortalité, double le risque de maladies cardiovasculaires, d'obésité, d'hypertension artérielle, de troubles lipidiques, de dépression et d'anxiété (Acakpo et al., 2001).

Les lipides jouent un rôle important dans le déterminisme de l'obésité. Chez l'humain, les compartiments de réserve énergétique sont principalement occupés par les lipides. Or l'adaptation entre les quantités oxydées et les quantités ingérées de lipides n'est pas bonne. Lorsque la balance lipidique est positive, la balance énergétique l'est également.

4.2.8. Les lipides

Les lipides de l'organisme peuvent être subdivisés en trois groupes :

- les lipides cellulaires sont essentiellement de deux types, d'une part les lipides structuraux qui sont une partie intégrante des membranes et autres structures cellulaires, d'autre part, les adipocytes neutres stockées dans les membranes. Durant un jeûne les adipocytes neutres sont mobilisées mais les lipides structuraux sont préservés.
- l'adipocyte brune est un type spécial de lipide. Elle représente une faible fraction des adipocytes corporelles totales. Elle est localisée entre les omoplates, à la nuque, le long des gros vaisseaux du thorax et de l'abdomen, et dans divers autres endroits.
- les lipides plasmatiques sur lesquels nous nous appesantirons.

4.2.8.1. Les lipides plasmatiques

Ils sont représentés par le cholestérol, les triglycérides, les acides gras non estérifiés, et les phospholipides. Ils ne circulent pas sous une forme libre. Les acides gras non estérifiés se lient à l'albumine ; le cholestérol, les triglycérides et les phospholipides entrent dans la composition des complexes lipoprotéiques. Ainsi liés, les lipides sont beaucoup plus solubles.

4.2.8.2 Le cholestérol

Le cholestérol tire son nom du grec chole (bile) et de stereos (solide). C'est un lipide de la famille des stérols. Il a deux origines essentiellement :

- alimentaire (viande, œuf, abats, produits laitiers…) dans 30% des cas

- hépatique dans 70% des cas

Le cholestérol est présent sous forme de stérides (cholestérol estérifié) dans la plupart des tissus des vertébrés (foie, cerveau, moelle épinière).

4.2.8.2.1. Structure et synthèse du cholestérol

La molécule de cholestérol est formée d'un noyau cyclo-pentano-phénantrénique ; elle comporte une fonction hydroxyle. Elle est très hydrophobe (coefficient de solubilité : 5 micromoles). Sa formule moléculaire est $C_{27}H_{46}O$ avec une masse molaire de 386,65 g/mol.

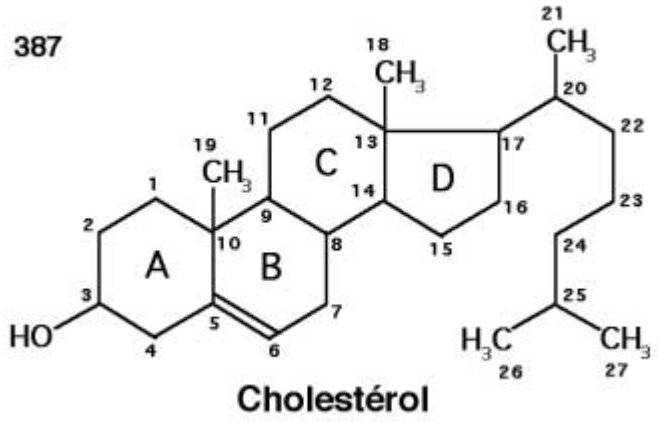


Figure 10. Structure du cholestérol

La numérotation des atomes de carbone du cholestérol est unique pour tous les dérivés biologiques qui en dérivent dans notre métabolisme.
• Les quatre cycles du noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène sont désignés par les lettres A, B, C et D.
• Le carbone en haut du cycle A portant le n°1, les atomes des deux cycles A et B sont numérotés à la suite en tournant dans le sens direct (1 à 10) ; on passe ensuite aux atomes du cycle C (11 à 14) puis D (15 à 17). Les radicaux méthyles liés aux carbones 13 et 10 sont désignés par les nombres 18 et 19. Enfin, ceux de la chaîne latérale sont désignés : 20 et 21 ; sur le carbone 20 sont liés les carbones 22 à 25 avec les deux derniers méthyl 26 et 27. Le lanostérol porte 3 méthyles supplémentaires désignés 28, 29 et 30.
• Les substituants du noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène peuvent être liés en avant du plan de l'écran (espace β) ou en arrière (espace α).

Le cholestérol est soit fourni à l'organisme par les lipoprotéines circulantes, soit synthétisé par les cellules. La synthèse se fait dans le cytoplasme suivant une voie métabolique. Elle est principalement hépatique mais peut se faire dans toutes les autres cellules de l'organisme. Elle se fait à partir de l'hydroxy-méthyl-glutamyl-coenzyme A (HMG-coA) **;** celle-ci provient de

la condensation de trois molécules d'acétyl-coenzyme A (venant des peroxysomes). L'enzyme clé de la synthèse du cholestérol est l'hydroxy-méthyl-glutamyl-coenzyme A réductase (HMG-coA réductase) qui permet la transformation de l'HMG-coA en mévalonate. Cette enzyme se trouve dans le réticulum endoplasmique. Par ailleurs, sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique, il existe une protéine (Sterol Regulatory Binding Protein : SREBP) qui agit comme un facteur de transcription des gènes qui participent à la régulation du taux de cholestérol dans les cellules.

La voie métabolique de synthèse est rétroinhibée par le cholestérol. En effet quand l'alimentation est riche en cholestérol, la synthèse hépatique diminue et vice versa.

Notons que des radicaux prénoïdes (isopentényl, géranyl, fainesyl) sont également produits par cette voie métabolique, mais en faibles quantités.

Le cholestérol est dégradé par la 7-α-hydroxylase en acides biliaires.

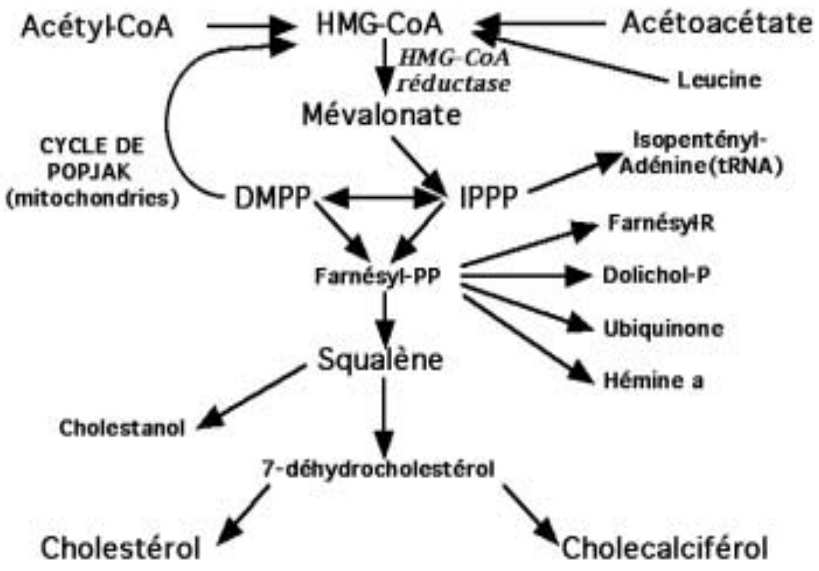


Figure 11. Synthèse du cholestérol

4.2.8.2.2. Rôle du cholestérol

Le cholestérol est un important constituant des membranes cellulaires. Il s'intercale entre les phospholipides contribuant à la fluidité des membranes. Il est également le précurseur de nombreuses autres molécules :

- le cholécalciférol (vitamine D_3) dans la peau
- les hormones stéroïdes (cortisol, cortisone, aldostérone) dans les surrénales
- les stéroïdes sexuels (progestérone, œstrogène, testostérone) dans les gonades
- les acides biliaires dans le foie.

C'est donc un constituant physiologique de l'organisme ; mais son excès est à la base de diverses pathologies. De même, une anomalie de synthèse du cholestérol peut aboutir à des pathologies telles que la chondrodystrophie calcifiante congénitale, ou le syndrome de Smith-Lemli-Opitz.

4.2.8.3. Les triglycérides et les acides gras

Les triglycérides sont des adipocytes neutres. Ils sont formés de trois acides gras attachés à un glycérol. Leur origine est essentiellement intestinale et hépatique. Les acides gras peuvent être saturés (sans double liaison) ou insaturés (déshydrogénés, avec un nombre variable de doubles liaisons).

4.2.8.4 Les lipoprotéines et les apolipoprotéines

Etant hydrophobes, le cholestérol et les triglycérides nécessitent pour être transportés, d'être encapsulés dans une enveloppe de phospholipides et de protéines (apoprotéines) appelée

apolipoprotéine. Le couple lipides plus protéine constitue une lipoprotéine. Chaque lipoprotéine contient ainsi des milliers de molécules lipidiques (triglycérides et cholestérol en proportions variables) et une molécule d'apoprotéine.

4.2.8.4.1. Lipoprotéines

On divise les lipoprotéines en six classes selon leur taille et leur contenu en lipides. Leur densité et donc leur vitesse de sédimentation est inversement proportionnelle à leur contenu en lipides.

Dans un sérum normal à jeun, les lipoprotéines se répartissent dans un gradient de concentration saline en trois principales zones de densité :

-les lipoprotéines à très basse densité (Very Low Density Lipoproteins = VLDL) : moins de 15%

- les lipoprotéines à basse densité (Low Density Lipoproteins = LDL) : 55%

- les lipoprotéines à haute densité (High Density Lipoproteins = HDL) : 30%. Ils sont synthétisés dans le foie et les intestins.

Les HDL sont subdivisées en trois zones d'inégale importance :

- Les HDL1, les plus légères représentent une fraction mineure
- les HDL2 plus denses ont une concentration variable. Elles sont généralement quantitativement plus importantes chez la femme et l'enfant que chez l'homme
- les HDL3 représentent la fraction la plus dense et la plus quantitativement importante des HDL. Sa concentration est à peu près identique dans les deux sexes.

Les autres types de lipoprotéines sont :

- Les lipoprotéines de densité intermédiaire (Intermediate density lipoproteins = IDL) qui ont une densité intermédiaire entre celle des VLDL et des LDL. Elles sont mineures à jeun.
- les chylomicrons qui s'isolent à une densité inférieure à celle des VLDL. Ils se forment dans la muqueuse de l'intestin durant l'absorption des produits issus de la digestion des adipocytes. Ils existent donc chez le sujet normal dans les périodes postprandiales. Les chylomicrons sont constitués à 90% de triglycérides d'origine alimentaire. Enfin une dernière fraction est constituée des résidus de chylomicrons encore appelés remnants.

Les lipoprotéines sont organisées en une voie exogène et une voie endogène.

Les lipides exogènes d'origine alimentaire utilisent le système de transport composé des chylomicrons et de leurs résidus. Ces particules résiduelles sont apportées au foie, où elles se lient aux récepteurs des résidus de chylomicrons et des LDL. Elles sont immédiatement internalisées par une endocytose dépendante des récepteurs et dégradées dans les lysosomes.
Quant au système endogène il est sous-tendu par les VLDL, IDL, LDL, et HDL. Ces lipoprotéines assurent le transport des triglycérides et du cholestérol entre les différentes parties du corps.

Les VLDL se forment dans le foie et transportent les triglycérides qui y sont synthétisés vers les tissus extra hépatiques. Après avoir perdu une bonne partie de leurs triglycérides sous l'action de la lipoprotéine lipase endothéliale, ces VLDL deviennent des IDL.

Certaines IDL sont captées par le foie ; celles qui restent perdent encore plus de triglycérides et de protéines et deviennent alors des LDL. La concentration des lipoprotéines en cholestérol augmente ainsi relativement, au fur et à mesure qu'elles s'appauvrissent en triglycérides. L'enrichissement en cholestérol se fait aussi lors d'échanges avec le HDL par l'intermédiaire d'une protéine de transfert : Cholesterol Ester Transfer Protein (CETP).

Les LDL approvisionnent les tissus en cholestérol ; elles transportent les 2/3 du cholestérol circulant à toutes les cellules de l'organisme pour le renouvellement des membranes cellulaires. Selon leurs besoins en cholestérol, les cellules expriment plus ou moins de récepteurs aux LDL. Au niveau du foie il existe beaucoup de récepteurs aux LDL car les besoins en cholestérol (pour la synthèse des acides biliaires) sont importants. Les molécules de LDL sont captées dans le foie par une endocytose dépendante des récepteurs. L'endosome fusionne ensuite avec un lysosome et la lipase acide qui s'y trouve hydrolyse les esters de cholestérol, fournissant ainsi du cholestérol libre que la cellule peut utiliser.

Les LDL sont aussi captées par un système de plus faible affinité présent dans les macrophages et autres cellules. En fait, il existe en dehors des LDL natives, d'autres LDL anormales (petites et denses). Celles-ci ont peu d'affinité pour leurs récepteurs et restent dans la circulation jusqu'à pénétrer les parois artérielles. Elles y subissent une oxydation et une captation par les macrophages ″éboueurs″. Ces cellules agissent par l'intermédiaire de leurs « scavenger receptors ».

Lorsque les macrophages sont ainsi surchargés, ils deviennent des cellules spumeuses (foam cells) qui à leur tour stimulent une réaction inflammatoire sous endothéliale. Les cellules

spumeuses sont observées dans les lésions athéroscléreuses précoces. Ceci confère un rôle athérogène aux LDL.

Il semble que les HDL recaptent le cholestérol des parois artérielles qu'elles ramènent au foie. Le cholestérol est ensuite excrété dans la bile, aidant ainsi à abaisser la cholestérolémie. D'où le rôle anti-athérogène des HDL.

La lipoprotéine (a) est une LDL qui contient une apoprotéine particulière nommée (a). Un taux élevé de cette LDL (> 30 mg/dL) est un facteur de risque indépendant d'infarctus du myocarde.

4.2.8.4.2. Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines sont des glycoprotéines. Leur masse moléculaire est très variable, de 6.500 à 550.000 daltons. Elles sont réparties en groupes : A, B, C, D, et E. Les apolipoprotéines se répartissent diversement dans les lipoprotéines.

Ainsi, la membrane entourant les HDL est constituée de 65% d'apoprotéines A-I. Le taux sérique de ces derniers est de 1,4 ± 0,3 g/L.

Les apolipoprotéines B-100 se répartissent exclusivement dans les lipoprotéines de basse densité ; elles représentent la totalité des apoprotéines des LDL et 30% de celles des VLDL. Leur concentration est de 1± 0,3 g/L dans le sérum.

Les apolipoprotéines C (C-I, C-II, C-III) et les E se répartissent entre les VLDL, les IDL et les HDL. La membrane des chylomicrons est composée des apolipoprotéines A-I, A-II, C, E d'origine hépatique et des apolipoprotéines A-IV et B-48 d'origine exclusivement intestinale.
Les apolipoprotéines donnent par leurs points isoélectriques variés, des mobilités différentes aux lipoprotéines en électrophorèse. Les HDL migrent parmi les α-globulines (d'où leur nom d'alpha lipoprotéines), les LDL migrent parmi les β-globulines (bêta lipoprotéines) et enfin les VLDL migrent entre les deux (α_2-lipoprotéines ou pré-β-lipoprotéines).

Les valeurs lipidiques normales peuvent se définir comme celles qui n'induisent pas d'athérosclérose, même en présence de facteurs de risque non lipidiques. Les valeurs optimales sont fort exigeantes et présentes seulement chez une minorité de la population. Il ne s'agit donc pas de simples normes de laboratoire.

D'après les recommandations internationales, les taux de lipides ne doivent pas être considérés isolément mais doivent être mis en relation avec la présence d'autres facteurs pour définir le risque cardio-vasculaire.

En l'absence de facteur de risque cardio-vasculaire, les taux suivants sont considérés comme normaux :

- cholestérol total < 1,90 g/L
- cholestérol HDL > 0,50 g/L chez la femme (> 0,40 g/L chez l'homme)
- triglycérides < 1,50 g/L
- cholestérol LDL < 1,60 g/L.

En cas de modifications pathologiques primitives ou secondaires des lipides sériques, on parle de dyslipidémies.

En pratique ce terme regroupe :

- les hypercholestérolémies pures
- les hypertriglycéridémies
- les hyperlipidémies mixtes qui associent les deux entités précédentes.
-

Les hypercholestérolémies ont un rôle primordial dans la constitution des maladies cardiovasculaires puisqu'elles participent à la genèse de l'athérosclérose. C'est la fraction LDL qui exerce l'action athérogène.

Le rôle athérogène des triglycérides est moindre que celui du LDL cholestérol, mais il est d'autant plus élevé que le HDL est bas.

La plupart des dyslipidémies résultent d'une interaction entre génétique et environnement. Les dyslipidémies purement génétiques sont rares ; de même les dyslipidémies purement acquises sont peu fréquentes. Les dyslipidémies athérogènes couramment détectables sont :

- l'hypercholestérolémie LDL
- l'hypocholestérolémie HDL
- l'hypertriglycéridémie
- l'hyperlipoprotéinémie (a).

4.2.8.5. Rôle des adipocytes dans le syndrome métabolique

Les adipocytes sont des cellules conjonctives fixes, arrondies, isolées ou constitutives du tissu adipeux, hébergeant dans leurs cytoplasmes une volumineuse gouttelette lipidique.

On distingue trois types de tissus adipeux de topographies différentes : le tissu adipeux gynoïde, le tissu adipeux androïde sous–cutané et le tissu adipeux viscéral :

- le tissu adipeux gynoïde résulte d'une hyperplasie adipocytaire. Son développement serait favorisé par la progestérone et inhibé par les androgènes. Il n'est sensible à la lipolyse que lors de la lactation. Le tissu adipeux gynoïde apparaît ainsi comme un tissu de réserve énergétique essentiel pour la survie de l'espèce.
- le tissu adipeux androïde qu'il soit sous-cutané ou périviscéral résulte d'une hypertrophie adipocytaire. Il est caractérisé par une sensibilité lipolytique importante. Cette topographie ″cushingoïde″ avec surcharge adipeuse viscérale serait favorisée par plusieurs facteurs dont l'hyperinsulinisme.

Le tissu adipeux est actuellement considéré comme un véritable organe endocrinien et non plus uniquement comme un lieu où l'énergie est stockée en attendant d'être mobilisée. En effet plusieurs études ont établi que le tissu adipeux est capable de sécréter de nombreuses molécules de nature peptidique ou non, dotées de propriétés régulatrices ; on les regroupe sous le terme d'adipocytokines (Mohamed-Ali et al, 1998 ; Trayhurn et al, 2004).

On peut citer :

- la leptine : qui intervient dans la régulation hypothalamique du poids corporel.
- le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) : qui induit l'insulino-résistance
- l'interleukine - 6 (IL - 6)
- la résistine

- l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) : qui est un agent anti-fibrinolytique induisant une augmentation du risque thrombotique.
- l'angiotensinogène et l'angiotensine : qui influencent la fonction vasculaire et participent à la régulation de la pression artérielle
- les protéines de la voie alterne du complément
- le TGF-β (transforming growth factor- β)

Par ailleurs des prostaglandines (PGE-2), des protéines impliquées dans la régulation du métabolisme lipidique, des oestrogènes (chez la femme ménopausée) sont également synthétisés et sécrétés par le tissu adipeux.

Les adipocytokines agissent soit par voie endocrine, soit par voie paracrine ou autocrine.
Virtuellement, tous les facteurs sécrétés par le tissu adipeux vont être modifiés lors de variations de masse grasse, qu'il s'agisse d'augmentation (obésité) ou de diminution anormale (cachexie, lipoatrophie).

4.2.8.5.1. La leptine

La leptine est une hormone protéique de 16 KDa synthétisée en priorité par les tissus adipeux et encodée par le gène ob (obese). Elle autorégule ses taux plasmatiques en fonction de la diminution ou de l'augmentation des réserves adipeuses selon un feed-back négatif. Elle agit sur son principal tissu cible (l'hypothalamus) après s'être liée à un récepteur de type «cytokine» qui lui est propre, et ainsi influencer la sensibilité à l'insuline (Fasshauer et al., 2003).

L’action centrale de la leptine consiste en :

- une induction de la satiété
- une augmentation des dépenses énergétiques
- une adaptation neuro-endocrine au jeûne

Par ailleurs, la leptine joue un rôle important dans l’induction de la puberté puis dans le maintien d’une activité normale de l’axe gonadotrope et de la fertilité (Harris, 2000). Ceci pourrait expliquer la diminution de l’activité de l’axe gonadotrope habituellement observée chez les personnes atteintes d’obésité pathologique.

A côté de son action centrale, la leptine peut agir directement sur certains tissus périphériques. Ainsi, au niveau musculaire, elle augmente la sensibilité à l’insuline et l’utilisation du glucose. Elle entraîne une insulinorésistance au niveau des adipocytes, atténue l’effet inhibiteur de l’insuline sur la néoglucogenèse hépatique, inhibe la sécrétion d’insuline par les cellules β du pancréas endocrine.

Des récepteurs de la leptine sont également présents au niveau des tissus cibles du métabolisme énergétique (foie, muscles et tissu adipeux), tissus dans lesquels la leptine favorise l’oxydation des acides gras. En cas de résistance à la leptine, une accumulation de triglycérides se produirait en dehors du tissu adipeux, induisant une résistance hépatique et musculaire à l’insuline et inhibant sa sécrétion pancréatique par un phénomène de lipotoxicité (Sandoval et al., 2003).

4.2.8.5.2. L'adiponectine

L'adiponectine est une protéine fortement exprimée dans le tissu adipeux. Elle est connue sous plusieurs noms [ACRP30 (*Adipocyte Complement-Related Protein of 30 kDa*) ou adipoQ] chez la souris et [GBP28 (*Gelatin-Binding Protein* 28) ou APM1 (*AdiPose Most abundant gene transcript 1*)] chez l'homme (Kadowaki et al., 2005). Ses concentrations circulantes, qui représentent 0,01% des protéines plasmatiques, sont de l'ordre de 5 à 30 mg/L chez des sujets minces, alors que celles en leptine ne sont que de 2 à 8 µg/L.

Contrairement aux autres adipocytokines, elle possède plusieurs particularités, qui font son originalité :

- les concentrations circulantes d'adiponectine sont diminuées chez les patients obèses insulinorésistants, chez les patients diabétiques de type 2 et chez les sujets présentant une maladie coronaire ;
- il existe une relation étroite entre l'adiponectinémie et la sensibilité à l'insuline et une relation inverse entre l'adiponectinémie et le degré d'obésité chez l'homme, qui touche plus particulièrement les adipocytes viscérales ;
- les mécanismes d'action de l'adiponectine en font une molécule qui jouerait un rôle protecteur contre l'athéroclérose et l'insulinorésistance. Le mode d'action de l'adiponectine sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline se ferait via l'activation d'une enzyme, l'AMP *Activated Protein Kinase* (AMPK), dont un des rôles serait de moduler les concentrations cellulaires de malonyl CoA, en inhibant l'acétyl CoA carboxylase (enzyme intervenant dans la dégradation du malonyl CoA) (Yamauchi et al., 2002). Ceci aurait pour conséquence une diminution du malonyl CoA intracellulaire, avec diminution de la lipogenèse, associée à une augmentation de la

bêta-oxydation des acides gras. L'adiponectine agirait aussi sur la production hépatique de glucose, en diminuant l'expression des ARNm de deux enzymes essentielles de la néoglucogenèse, la phosphoénolpyruvate carboxykinase et la glucose-6-phosphatase (Kadowaki et al., 2005).

Outre ses effets sur la sensibilité à l'insuline, l'adiponectine exercerait un effet protecteur vasculaire, en agissant très précocement dans le processus d'athérogenèse, en intervenant dans la régulation de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales vasculaires (Ouchi et al., 1999), la transformation des macrophages en cellules spumeuses, et en modulant la prolifération des cellules musculaires lisses (Arita et al., 2002).

4.2.8.5.3. La résistine

La résistine est exprimée par le tissu adipeux chez l'humain avec une sécrétion particulièrement intense par les adipocytes au niveau abdominal. Chez l'Homme sain l'expression du gène est très faible et ne semble pas liée à la sensibilité à l'insuline (Shuldiner et al., 2001).

La régulation de la sécrétion de résistine est sans doute complexe et elle n'est pas encore entièrement élucidée. L'expression du gène de la résistine dans les adipocytes (en particulier chez la souris) est augmentée par les glucocorticoïdes et l'hyperglycémie sévère. Cependant, il semblerait que le TNF-α exerce paradoxalement un effet inhibiteur de l'expression de ce gène.

Il faut noter que les premiers résultats d'études menées sont contradictoires et ne vont pas dans le sens d'une contribution forte du gène au syndrome métabolique chez l'humain.

4.2.8.5.4. L'angiotensinogène et l'angiotensine II

L'angiotensinogène de même que les protéines enzymatiques impliquées dans sa conversion en angiotensine II, sont exprimés dans le tissu adipeux. Leur mode d'action est de type auto et paracrine. L'expression du gène codant pour l'angiotensinogène est stimulée par une concentration élevée d'acides gras. (Yvan-Charvet et al., 2005).

Les concentrations circulantes de l'angiotensinogène sont corrélées non seulement à la pression artérielle mais également avec l'indice de masse corporelle. Il est donc hautement vraisemblable que la production excessive de l'angiotensinogène et de l'angiotensine II intervienne dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle (HTA) associée à l'obésité.

En dehors de son impact sur l'hypertension (tableau ci-dessous) et sur les anomalies de la fonction endothéliale chez les sujets obèses, la production excessive de l'angiotensine II par les adipocytes pourrait également augmenter le risque thrombotique. En effet, il a été récemment démontré que l'angiotensine II stimule de manière auto et paracrine la production de PAI-1 par les adipocytes humains.

	TA systolique (mm Hg)		TA diastolique (mm Hg)
Normale	< 120	et	< 80
Pré hypertension	120 – 139	ou	80 – 89
Hypertension stade 1	140 – 159	ou	90 – 99
Hypertension stade 2	≥ 160	ou	≥ 100

Tableau 5. Classification de la tension artérielle selon les normes de la Joint National Committee (JNC) VII**.** Septième rapport du JNC, NIH Publication N° 03 – 5233, May 2003.

Puisque l'angiotensine II induit l'expression de PAI-1 suite à la stimulation de ses récepteurs de type 1, l'utilisation des médicaments qui bloquent ces récepteurs dans le traitement de l'hypertension associée à l'obésité pourrait en même temps réduire le risque thrombo-embolique.

4.2.8.5.5. L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) et TNF alpha.

Le PAI-1 inhibe la fibrinolyse et augmente le risque thrombotique. Il est exprimé et sécrété chez l'Homme surtout dans le tissu adipeux viscéral. Ses concentrations plasmatiques sont plus élevées chez les sujets obèses que chez les sujets de poids normal (particulièrement lorsqu'une obésité abdominale est associée à une insulinorésistance). L'expression du PAI-1 est stimulée par les facteurs impliqués dans l'insulinorésistance (TNF-α, angiotensine II, glucocorticoïdes) et par d'autres facteurs tels que TGF- β, interleukine-1β. Par contre le troglitazone qui améliore la sensibilité à l'insuline, exerce un effet inhibiteur sur cette expression. L'utilisation du thiazolidinedione pourrait donc également réduire le risque thrombotique chez les sujets obèses et diabétiques.

Le TNF-α, cytokine intervenant dans les processus inflammatoires et immunitaires, est également surexprimé par les adipocytes des sujets atteints d'obésité pathologique. Il participe à l'apparition de l'insulinorésistance qui accompagne l'accumulation des adipocytes au niveau viscéral (Montague et al., 1998).

4.2.8.6. L'insuline

L'insuline est une hormone peptidique composée de 51 acides aminés répartis en deux chaînes peptidiques (chaînes A et B). Son poids moléculaire est de 5.808 daltons. La synthèse de l'insuline a lieu dans les cellules β du pancréas endocrine.

Les hexoses (glucose, mannose) sont de puissants stimulateurs la synthèse et de la sécrétion de l'insuline. Il existe dans l'organisme des hormones de contre- régulation de la sécrétion insulinique : catécholamines, glucagon et hormone de croissance. La demi-vie de l'insuline est de 4 à 5 minutes ; son inactivation est principalement hépatique (au moins 50% de l'insuline sécrétée) mais aussi rénale.

4.2.8.6.1. Rôle de l'insuline sur le métabolisme des lipoprotéines

L'insuline joue un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme lipidique. Les principaux sites d'action de l'insuline sur le métabolisme des lipoprotéines sont indiqués sur la figure ci-dessous.

Au niveau du tissu adipeux, l'insuline inhibe la lipase hormonosensible. Elle a ainsi un effet antilypolitique favorisant le stockage des triglycérides dans l'adipocyte et réduisant le déversement d'acides gras non estérifiés dans la circulation.

Au niveau hépatique, l'insuline inhibe la production de VLDL. L'effet inhibiteur de l'insuline sur la production hépatique de VLDL a clairement été mis en évidence in vivo. C'est ainsi que chez le sujet sain, il est observé sous l'effet de l'insuline une inhibition de la production de VLDL-triglycérides (–67 %) et de la production d'apo B des VLDL (–52 %) (Lewis et al.,

1993 ; Malmström et al., 1998). L'insuline apparaît réduire la production de VLDL, non seulement en diminuant le taux des acides gras non estérifiés dans la circulation (limitant ainsi les substrats nécessaires à la formation des VLDL), mais aussi par un effet inhibiteur direct dans l'hépatocyte (Malmström et al., 1998).

L'insuline, par son action stimulatrice de la lipoprotéine lipase, favorise le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides (chylomicrons, chylomicron-remnants, VLDL et IDL). Il a été montré que l'insuline augmentait directement l'activité de la lipoprotéine lipase (Taskinen et al., 1992). Par ailleurs, il est observé sous l'effet de l'insuline une augmentation de l'ARN messager de la lipoprotéine lipase dans le tissu adipeux, témoignant d'un effet positif direct de l'insuline sur sa synthèse (Fried et al., 1993).

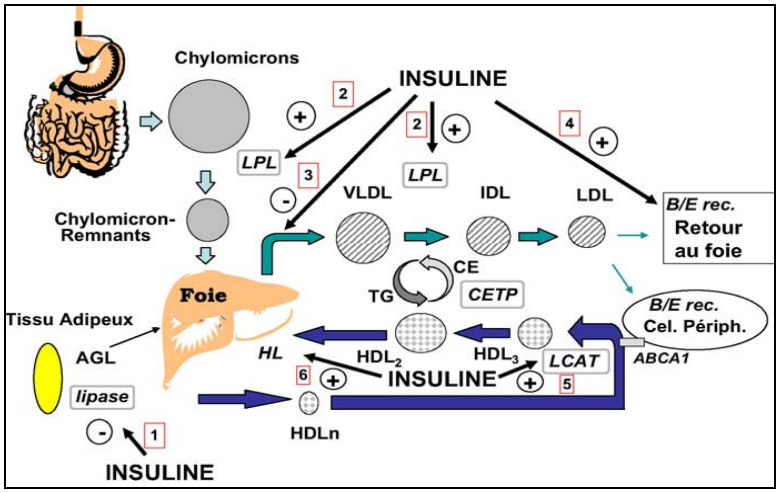


Figure 12. Principaux sites d'action de l'insuline dans le métabolisme des lipides.

VLDL : Very Low Density Lipoprotein ; IDL : Intermediate Density Lipoprotein, LDL : Low Density Lipoprotein ; HDL : High Density Lipoprotein ; LPL : lipoprotéine lipase ; HL : hépatique lipase ; CETP : Cholesteryl ester Transfer protein ; LCAT : lecithin-cholesterol acyl transferase ; AGL : acides gras non estérifiés ; LRP : LDL-receptor related protein ; B/E rec. : récepteur B/E (LDL récepteur) ; ABCA1 : ATP binding cassette transporteur A1. 1 : l'insuline inhibe la lipase hormone-sensitive ; 2 : l'insuline active la LipoProtéine Lipase (LPL) ; 3 : l'insuline inhibe la production hépatique de VLDL ; 4 : l'insuline augmente l'expression des récepteurs LDL (B/E rec) ; 5 : l'insuline active la LCAT ; 6 : l'insuline active l'hépatique Lipase (HL) [Vergès, Nutrition clinique et métabolisme 21 (2007) 9–16].

L'insulinémie peut être dosée par radio-immunologie, et est généralement exprimée en unité d'action biologique. Les taux à jeun sont inférieurs à 20 µUI/mL, ce qui correspond à 0,8 ng/mL ou à 138 pmol d'insuline par litre.

Les effets métaboliques de l'insuline sont essentiellement de type anabolique (c'est-à-dire qu'ils aboutissent à la mise en réserve de nutriments) ; Ils intéressent aussi bien les glucides, les protéines que les lipides. L'insuline a une action hypoglycémiante. En périphérie elle favorise l'accélération de l'utilisation musculaire du glucose. L'insuline stimule la synthèse des protéines par le foie, les muscles, et autres tissus périphériques. Ceci concourt à un bilan protidique positif favorisant la croissance. Enfin, l'hormone a une action anti-lipolytique. Dans les adipocytes, elle stimule d'une part l'accumulation des triglycérides (en favorisant la synthèse et l'activité de la lipoprotéine lipase), d'autre part elle inhibe la lipolyse. Le taux circulant de triglycérides est donc abaissé dans les conditions physiologiques par l'insuline. C'est ce qui explique que certains auteurs considèrent l'hypertriglycéridémie comme un signe indirect d'insulinorésistance.

4.2.8.6.2. L'insulinorésistance

L'insulinorésistance est un état métabolique physiologique ou pathologique au cours duquel les cellules cibles de l'insuline ne répondent pas suffisamment, en terme de glucorégulation, à la présence de taux circulants normaux ou élevés d'insuline (Bloomgarden, 2004).

L'insulinorésistance est un facteur de risque cardio-vasculaire ″émergent″. En effet, une résistance chronique à l'insuline est fortement associée au développement de complications macrovasculaires. Les marqueurs prédictifs de risque de développer une résistance à l'insuline comportent :

-des facteurs génétiques

- l'origine ethno-géographique

- la sédentarité

- le tabagisme

- la malnutrition fœtale et/ou un poids de naissance abaissé pour la taille
- mais surtout et avant tout, le développement d'une surcharge pondérale et d'une obésité de type androïde

Lorsqu'il existe une insulinorésistance, on observe souvent une hyperinsulinémie chronique compensatoire. Les effets métaboliques de l'insuline au niveau de ses tissus cibles suivent deux grandes voies de signalisation intracellulaire :

- l'une destinée aux effets métaboliques « rapides » (glucorégulation et métabolismes intermédiaires) : elle est médiée par la voie des Insulin Receptors Substrates (IRS) et de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-kinase)
- l'autre destinée aux effets « lents » (croissance tissulaire et mitogenèse) : elle est médiée par la voie des Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK). Une partie des conséquences adverses de l'insulino-résistance résulte d'une hyperactivation de cette voie (restée insulinosensible) par l'hyperinsulinémie chronique.

L'insulinorésistance peut être consécutive à un défaut situé au niveau de la liaison de l'insuline à son récepteur, en raison soit d'une diminution du nombre de récepteurs, soit d'une baisse de l'affinité de cette liaison (receptor defect). La glycémie peut être maintenue dans ce cas dans les limites normales grâce à une sécrétion excessive d'insuline ; d'où l'état d'hyperinsulinémie qui caractérise fréquemment ce type d'insulinorésistance. Les effets métaboliques de l'insuline peuvent ainsi être assurés moyennant l'élévation permanente des taux circulants d'insuline.

Lorsque le défaut est situé au-delà de la première étape de l'action cellulaire de l'insuline, «post-receptor defect», l'activité métabolique maximale de l'insuline ne peut plus être obtenue, même en présence de concentrations élevées de l'hormone. Il s'agit dans ce cas, soit d'une anomalie portant sur le nombre ou la localisation cellulaire des transporteurs de glucose, soit d'une activité insuffisante des enzymes impliquées dans la glycolyse et/ou dans l'oxydation des substrats glucidiques. Ces anomalies peuvent être consécutives à une élévation des taux circulants d'acides gras non estérifiés et à l'oxydation préférentielle de ces substrats lipidiques par les muscles.

Cette dernière forme d'insulinorésistance s'observe fréquemment chez les sujets obèses avec évolution vers le diabète non insulinodépendant. Elle peut également être la complication d'un hypercorticisme.

L'hyperinsulinisme précède de 10 à 20 ans la survenue d'un diabète de type 2. Au stade de début du syndrome métabolique, les patients peuvent présenter des chiffres glycémiques normaux. Puis au fur et à mesure que le syndrome s'amplifie, apparaît une hyperglycémie voire un diabète. Tous les patients porteurs d'un syndrome métabolique ne seront pas diabétiques ; mais ceux qui présenteront ces deux anomalies sont les plus à risque de développer des complications cardio-vasculaires.

En dehors des troubles de l'homéostasie glucidique, l'insulinorésistance intervient également dans la genèse de l'hypertension artérielle. Elle pourrait jouer un rôle dans la rétention rénale de sodium, responsable de l'expansion volémique et dans l'augmentation de la résistance vasculaire périphérique conduisant à l'HTA.

La détection de l'insulinorésistance ne se fait le plus souvent pas directement. L'insulinorésistance est appréciée par l'intermédiaire de la sensibilité à l'insuline. Le terme de sensibilité à l'insuline ne couvre pas nécessairement la sensibilité d'une cellule aux nombreux effets de l'insuline. En effet, certains tissus restent sensibles à l'insuline en présence d'une résistance musculaire nette (tissu ovarien et développement d'ovaires polykystiques ; acanthosis nigricans). La présence d'une insulinorésistance peut être confirmée par l'une des mesures suivantes :

- le test de tolérance IV au glucose (Intravenous Glucose Tolerance Test : IVGTT)
- le test court à l'insuline (Insulin Tolerance Test: ITT)
- le clamp eu- ou iso-glycémique et hyperinsulinémique
- l'Homeostasis Model Assessment (HOMA)
- le Continuous Glucose Infusion with Model Assessment (CIGMA).

Les marqueurs indirects d'insulinorésistance souvent pris en compte sont : l'hypertriglycéridémie, l'hyperinsulinémie, l'acanthosis nigricans. Mais il faut remarquer selon quelques auteurs que la relation entre insulinorésistance et insulinémie est faible dès lors que les sujets deviennent dysglycémiques ou lorsqu'ils ont une intolérance glycémique voire un diabète de type 2 (Buysschaert, 2004).

Sur le plan physiopathologique on retient que l'insuline favorise la synthèse d'ADN et la prolifération des kératinocytes en agissant sur les récepteurs à l'IGF-1 (Insulin Growth Factor ou somatomédine A). Ces récepteurs sont normalement sensibles à ces petites molécules (d'IGF-1) dont la structure est proche de celle de l'insuline. En cas de résistance périphérique

à l’insuline, celle-ci peut alors interagir avec les récepteurs d’IGF-1 et déclencher l’épaississement épidermique (Humbert et al., 1998 ; Jaffiol et al., 1999).

Il est utile de signaler qu’une insulinorésistance peut exister en dehors d’un syndrome métabolique, notamment en présence d’obésité androïde, de diabète, d’hypertension essentielle, de syndrome polykystique des ovaires. Le taux d'homocystéine est significativement plus élevé chez les femmes porteuses d'un SOPK; cette élévation est plus significative si ces patientes présentent une résistance à l'insuline par rapport à celles qui n'avaient pas d'insulinorésistance. Il s'avère donc que l'insulinorésistance est le facteur essentiel influençant le taux d'homocystéine (Schachter, 2003).

4.2.8.7. Relation entre CRP et syndrome métabolique

La présence d’un syndrome métabolique prédispose au développement d’une inflammation vasculaire chronique qui se traduit par l’activation de macrophages, la production de cytokines et de divers marqueurs inflammatoires dont la CRP « ultrasensible ». La C-réactive protéine (CRP) est considérée comme un puissant et indépendant facteur prédictif aussi bien du diabète que des maladies cardiovasculaires. Elle reflèterait la charge d’athéromatose inflammatoire d’un individu. En outre, chaque paramètre constitutif du syndrome métabolique est corrélé à une augmentation des taux de CRP (Morrow., 2000).

Selon divers auteurs le risque cardiovasculaire en rapport avec l’élévation des taux de CRP est lié plus qu’à une simple inflammation. L’un des mécanismes pouvant expliquer l’effet de la CRP est sa capacité à potentialiser la libération du PAL-1 par les cellules endothéliales.

4.2.8.8. Traitement du syndrome métabolique

A l'heure actuelle, aucun médicament n'a d'indication spécifique dans le traitement du syndrome métabolique. La stratégie thérapeutique consiste à prendre en charge individuellement chaque facteur de risque (HTA, intolérance glucidique ou diabète, obésité, hyperlipidémie, troubles de l'hémostase et de la coagulabilité) même si pris isolément il ne justifie pas un traitement spécifique. Outre ces mesures, il faut associer le traitement de complications plus spécifiques.

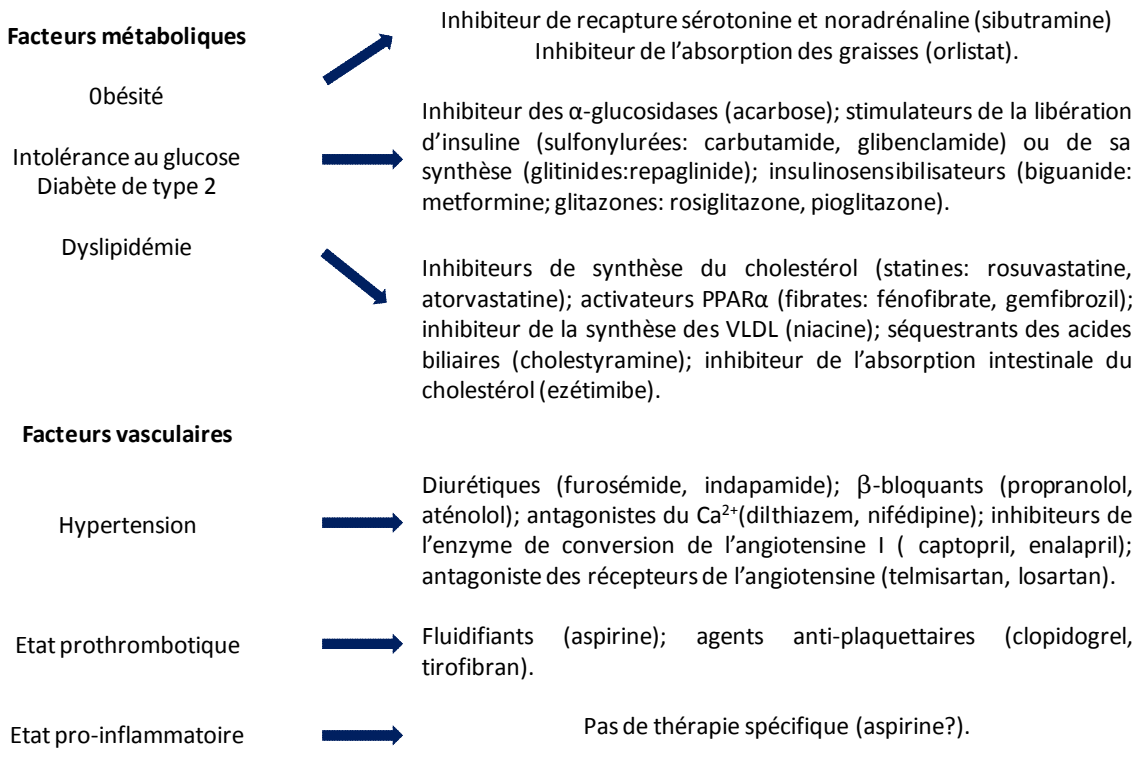


Figure 13. Composantes du syndrome métabolique, traitements médicamenteux et mécanismes d'action. Les facteurs de risque du syndrome métabolique sont regroupés en 2 sous-ensembles, métaboliques et vasculaires. Les classes de médicaments ou de composés mentionnés dans le traitement des facteurs de risque du syndrome métabolique sont citées à titre indicatif (Chobarian et al.2003).

Dans le but de réduire l'incidence de la maladie et de minimiser les dépenses de santé, tous les efforts doivent être orientés vers la prévention. La prise en charge du syndrome métabolique repose ainsi, sur les changements dans le régime alimentaire et le mode de vie, et

sur les thérapies pharmacologiques (Santé Canada. Lignes directrices pour la classification du poids chez les adultes, Catalogue H49-179, Ottawa, Santé Canada, 2003).

4.2.8.8.1. Les mesures hygiéno-diététiques

Elles ne s'adressent pas à une composante particulière du syndrome métabolique, mais participe dans une large mesure à la correction de chacune des anomalies métaboliques. Elles portent sur l'activité physique et l'alimentation. Une intervention précoce portant sur le mode de vie serait sans doute l'attitude préventive la plus efficace sur le plan coûts – bénéfices.

4.2.8.8.2. L'activité physique

Le rôle néfaste de la sédentarité dans le développement de l'insulinorésistance et du diabète de type 2 est formellement établi. L'exercice physique améliore la sensibilité à l'insuline. Le seuil minimal d'activité physique recommandé par l'OMS est de 30 minutes par jour d'activité physique d'intensité moyenne, et ce au moins 5 jours par semaine. Il n'est pas nécessaire de pratiquer l'activité physique journalière en une seule fois ; elle peut être répartie en trois fois 10 minutes. Plus l'activité pratiquée est d'intensité élevée, plus la durée nécessaire pour obtenir un effet bénéfique est raccourcie (Institut canadien d'information sur la santé. Améliorer la santé des Canadiens, Ottawa, Institut canadien d'information sur la santé, 2004).

Parmi les nombreuses activités simples que recommandent les experts on peut citer :

- la marche : c'est la plus pratiquée et « absolument gratuite » pouvant être réalisée en tout lieu ;

- les travaux domestiques tels que nettoyer le sol, épousseter les meubles.
- le jardinage
- le fait de se lever plutôt qu'utiliser la télécommande pour allumer la télévision.

4.2.8.8.3. La diététique

L'alimentation conseillée a les caractéristiques suivantes :

- l'apport énergétique y est réduit en fonction de la composition corporelle. Chez les sujets obèses on propose un régime hypocalorique de 1200 à 1500 Kcal par jour.
- elle contient préférentiellement les adipocytes poly- et mono-insaturées que l'on retrouve dans les poissons (même gras), les huiles végétales (olive, arachide…). Les adipocytes saturées (charcuterie, viandes, fromages, margarine) doivent être limitées.
- elle est riche en fruits, légumes et fibres.

Par ailleurs l'alcoolisme et le tabagisme doivent également être pris en compte. Les alcools en général ne contiennent pas de sucre mais apportent des calories.

4.2.8.8.4. Le traitement de l'obésité

L'obésité est une maladie chronique qui nécessite dès lors un traitement chronique. L'efficacité prouvée de la perte de poids sur plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire constitue la raison essentielle pour encourager les obèses à perdre du poids. En pratique, une perte pondérale de 5 à 10% du poids initial permet déjà de réduire de façon considérable les

risques pour la santé ; l'objectif du traitement n'étant pas de normaliser le poids. Le problème majeur sera ensuite de maintenir le poids stable à long terme.

La première étape du traitement est en règle la diététique. Cette prise en charge diététique doit être associée à une approche psychothérapeutique (thérapie comportementale, soutient de l'entourage). En cas d'échec des mesures hygiéno-diététiques, on associe les thérapies médicamenteuses (médicaments à action anorexigène ou à action anti-digestive), voire chirurgicales.

4.2.8.8.5. Le traitement des dyslipidémies

Le traitement initial est ici encore hygiéno-diététique. En effet, les valeurs lipidiques peuvent être améliorées par une meilleure hygiène alimentaire et physique.

En fonction du niveau de risque cardiovasculaire un traitement médicamenteux hypolipémiant sera associé. Ce traitement doit répondre aux critères suivants : efficacité sur les plans clinique et biologique, bonne tolérance, accessibilité financière pour le patient et la société.

En pratique courante, deux classes sont surtout utilisées : les fibrates et les statines, qui agissent selon un mécanisme génétique. Les fibrates améliorent le profil lipidique en agissant surtout sur les VLDL par diminution de leur synthèse et majoration de leur métabolisme périphérique. Par ailleurs elles stimulent la lipoprotéine lipase et augmentent la synthèse de l'apoprotéine A (ce qui permet l'accroissement du taux de HDL).

Les statines quant à elles, sont des inhibiteurs de l'HMG – coA réductase. Elles agissent en augmentant l'expression des récepteurs hépatocytaires aux LDL.

4.2.8.8.6. Traitement de l'hypertension artérielle et du diabète

Le rapport du JNC VII ne mentionne aucune spécificité en ce qui concerne le traitement antihypertenseur des personnes présentant un syndrome métabolique. Certaines données doivent cependant être prises en compte :

- Les combinaisons incluant des diurétiques à doses adéquates donnent de meilleures réponses thérapeutiques que les monothérapies.
- L'importance de l'angiotensinogène et de l'angiotensine II dans la genèse de l'HTA du syndrome métabolique, suggère qu'on ait recours aux IEC ou aux antagonistes de l'angiotensine II pour la correction de cette anomalie.

Pour le traitement des troubles glycémiques, la palette classique de traitement du diabète de type 2 peut être utilisée chez les personnes ayant un syndrome métabolique. Cette palette a été complétée par de nouvelles molécules d'insulinosensibilisants :

- les biguanides (Metformine) qui ont indéniablement fait leur preuve chez le diabétique de type 2, le sujet obèse et insulinorésistant. Ils entraînent une réduction de la production hépatique de glucose, une augmentation de la sensibilité périphérique à l'insuline. Ces molécules permettent donc d'améliorer certains paramètres associés au syndrome métabolique.

- les thiazolidinediones (TZD) ou glitazones ont un mécanisme d'action complexe qui résulte de l'activation de récepteurs nucléaires PPAR- γ (Peroxysome Proliferator – Activated Receptor – gamma) essentiellement au sein des adipocytes.

Les glitazones induisent la différenciation et le remodelage des adipocytes qui deviennent ainsi plus sensibles à l'insuline. A posologie adéquate les glitazones [Rosiglitazone (Avandia*) ; Pioglitazone (Actos*)] exercent un excellent effet sur la qualité du contrôle glycémique. Ils ont par ailleurs une bonne influence sur le métabolisme lipidique.

4. 3. Syndrome métabolique et homocystéine

Le syndrome métabolique (SM), l'un des principaux troubles qui président au diabète de type 2, peut aussi jouer un rôle fondamental dans le développement des maladies cardiovasculaires. En effet, l'hyperinsulinisme qui y est associé a des effets athérogènes directs ou indirects par des liens synergiques à d'autres facteurs. Certaines études (Conri et al., 2000) suggèrent qu'il y aurait parmi ces facteurs une concentration plasmatique élevée en homocystéine (Hcy).

Le mécanisme causant le syndrome métabolique (SM) est mal connu ; mais l'on pense que l'insulinorésistance en serait la cause principale (Cranford, 2003). Bien que des personnes vivant avec le SM aient une résistance à l'insuline, ce qui confère un risque élevé pour le diabète de type 2, la survenue du SM est perçue comme une maladie cardiovasculaire (MCV) (Ninomiya et al 2004).

L'Hcy est un aminoacide soufré formé lors du métabolisme de la méthionine. Ces dernières décennies, l'hyperhomocystéinémie a émergé et est considérée comme un important facteur de risque cardiovasculaire (Virtanen et al., 2005).

Il a été démontré que l'Hcy et le SM sont associés aux MCV; mais l'association entre le taux élevé de l'Hcy et le SM dans les MCV n'est pas encore bien élucidée.

En 2007, l'équipe de Ciaccio a recruté 126 patients dont 60 hommes et 66 femmes dans la tranche d'âge de 30- 72 ans présentant une angiopathie avec 50% de sténose contre 65 patients contrôle sans risque de MCV.

Vingt deux patients (17,4%) présentent une Hcy élevée, 32 (25,4%) un SM. Le SM et l'Hcy coexistent chez 72 (67,2%) ; ceci chez les 2 sexes.

La prévalence est observée dans le groupe Hcy + SM en comparaison avec l'Hcy et le SM isolément est statistiquement significative ($p < 0,001$). L'Hcy et le SM sont associés à la MCV (OR 2,53, 95% CI, 1,95- 12,43 et OR 5,74, 95% CI, 2,67- 12,34 respectivement). Ce résultat suggère que l'Hcy est un puissant indicateur des MCV quand elle est associée au SM.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les articles qui ont été publiés en rapport avec ce travail de thèse, ont en commun l'étude des perturbations du métabolisme de l'homocystéine sur les déterminants nutritionnels, environnementaux et génétiques des populations de l'Afrique au sud du Sahara notamment le Bénin et le Togo, deux proches pays de l'espace intertropical de l'Afrique de l'Ouest. Il s'agit de:

1. Evaluer les influences des déterminants nutritionnels, génétiques et environnementaux de l'Hcy au sein de ces populations de l'Afrique au sud du Sahara.

2. Déterminer la fréquence des polymorphismes au sein de la population étudiée et sa possible relation avec les altérations du métabolisme de l'Hcy pouvant permettre une explication physiopathologique.

3. Approfondir l'étude du mécanisme moléculaire liant le métabolisme de l'Hcy aux pathologies majeures qui perturbent au quotidien les populations de cette partie de l'Afrique de l'Ouest.

MATERIEL ET METHODES

1. Recrutement des populations d'intérêt

Toutes les études ont été soumises aux comités d'éthique locaux à l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin), Université du Bénin (Togo), IRCCS de Troina (Italie), Institut de Nutrition (Mexico). L'étude SUVIMAX est une étude nationale française coordonnée à Paris (Unité Inserm, Serge Hercberg).

1.1. Comparaison des déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones au Togo et au Bénin, en fonction du lieu de recrutement

Le recrutement porte sur une population tout venant en bonne santé apparente, d'âge adulte. Il a été réalisé sur trois sites, deux en régions urbaines, respectivement à Lomé et Cotonou et un dans la savane (région de Kara). Le recrutement au Togo s'est fait dans des centres de prévention primaire et a été coordonné par le Professeur Amouzou, Laboratoire de Nutrition, Université de Lomé. A Cotonou, il a été réalisé à partir d'une liste de personnes appartenant aux proches des étudiants et des chercheurs de l'Université sollicitées à partir d'un questionnaire et d'une information générale diffusée dans l'établissement. Les critères d'exclusion étaient la présence d'une pathologie identifiée, notamment infectieuse, cardiovasculaire et métabolique, et l'absence d'un contexte de malnutrition. Au total, 276 volontaires ont été recrutés dont 68 dans la région de Kara, 127 à Lomé et 81 à Cotonou. Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans les centres de recrutement respectifs et leur conservation a été centralisée sur les deux sites universitaires de Lomé et de Cotonou. Toutes les analyses biochimiques et génétiques ont été réalisées à l'Unité Inserm 724.

1.2. Comparaison des déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones en Afrique de l'Ouest, en Italie, en France et au Mexique.

1.2.1. Population d'Afrique de l'Ouest

Il s'agit de l'échantillon décrit dans le paragraphe 1.1

1.2.2. Population d'Italie

146 volontaires en bonne santé apparente ont été recrutés à Troina, Sicile, âgés de 20 à 60 ans, dans le contexte de la mise en place de la cohorte Oasi, sur laquelle repose le projet Nutrivigène. Les critères d'exclusion étaient l'absence de pathologie chronique et de traitement médical en cours.

1.2.3. Population du nord-est de la France

Les critères d'exclusion étaient identiques à ceux de la population italienne, avec deux modes de recrutement, l'un dans un centre de médecine préventive (Région Lorraine) et l'autre sur la base d'un questionnaire d'une étude nationale (SUVIMAX).

1.2.4. Population du Mexique

Les 300 volontaires sont également âgés de 20 à 60 ans, il s'agit de donneurs de sang, volontaires sains qui ont subi un examen médical préventif et des analyses biologiques permettant d'éliminer une pathologie chronique inflammatoire ou infectieuse.

1.2.5. Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans chacun des centres recruteurs et centralisés en France à l'Unité Inserm 724, où toutes les analyses biochimiques et génétiques ont été effectuées.

1.3. Comparaison des déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocabones au Togo et au Bénin, en fonction du lieu de recrutement. Etude d'association avec l'hépatite virale B.

Cette étude a été réalisée sur le même échantillon de population qui a été complétée par un recrutement supplémentaire sur Cotonou avec un effectif total de 450 sujets.

1.4. Déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones : étude d'association avec la gravité du paludisme

L'étude porte sur 493 enfants des 2 sexes présentant un épisode d'accès palustre, pris en charge au centre de santé Ménontin de Cotonou. Un questionnaire systématique a été rempli par le médecin prenant en charge les patients, prenant en compte les critères de gravité définis par l'OMS en 2003. Parmi les items figure l'état nutritionnel, la durée de l'épisode, les principales complications, ainsi que les paramètres biologiques.

1.5. Comparaison des déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocabones : étude d'association avec l'obésité et le syndrome métabolique

Il s'agit d'une étude prospective dont le recrutement est réalisé sur deux sites, dont le marché Dantokpa, à Cotonou, sur des sujets âgés de 20 à 60 ans. Deux périodes de recrutement ont eu

lieu dont la première correspond à des sujets des deux sexes, décrits dans les paragraphes 1.1 et 1.3. C'est à la suite d'analyses préliminaires des données, montrant un lien entre syndrome métabolique et déterminants de l'homocystéine chez les femmes plutôt que chez les hommes, que nous avons complété notre étude en recrutant les femmes sur le marché Dantokpa. Les prélèvements sanguins réalisés sur les sites de recrutement ont été centralisés au Laboratoire de biochimie de l'Université d'Abomey-Calavi.

2. Analyses biochimiques

2.1. Dosage de l'homocystéine

2.1.1. Dosage de l'homocystéine par le système IMx

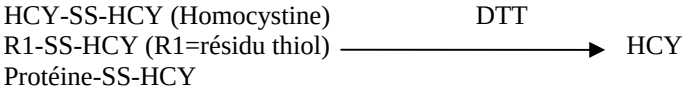
Fiche technique

Coffret IMX-Homocystéine, ABBOTT (Abbott Park, IL, Etats-Unis)

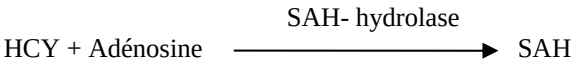
Principe du test

Le dosage IMx Homocystéine est basé sur la technologie immunoenzymatique par polarisation de fluorescence (FPIA). L'Hcy liée (forme oxdée) est réduite en Hcy libre, qui est à son tour convertie enzymatiquement en S-adénosyl-L-Hcy (SAH) comme décrit ci-dessous :

Réduction : L'homocystine, ses formes disulfures ainsi que les formes mixtes protéine-Hcy présentes dans l'échantillon sont réduites en Hcy libre sous l'action du dithiothréiol (DTT).



Conversion enzymatique : L'Hcy libre totale est convertie en S-adénosyl-L-Hcy (SAH) en utilisant de la SAH-hydrolase et de l'adénosine en excès.



Dans les conditions physiologiques, la SAH-hydrolase convertit la SAH en Hcy. L'adénosine en excès dans la solution de prétraitement permet de convertir l'Hcy en SAH par la SAH-hydrolase bovine.

Prélèvement des échantillons : les échantillons doivent être prélevés chez des individus à jeun.

Préparation de l'échantillon pour analyse

a. Sérum ou plasma: prélever le sang dans untube sec sous vide de 5 ou 10 ml. Si on prélève su sérum, laisser le sang formé un caillot à température ambiante pendant 30 à 60 min. Utiliser de l'EDTA si l'on veut faire une analyse sur le plasma. Centrifuger pendant 10 min et prélever le sérum ou le plasma.

b. Transport des échantillons: le sérum et le plasma soigneusement emballés doivent être transportés congelés du départ à l'arrivée.

c. Conservation des échantillons: Avant analyse, conserver les échantillons entre 2 et 8°C. Si l'on doit garder un échantillon plus de 4 heures, il faut le congeler à -20°C. Ne pas stocker les échantillons dans des congélateurs à dégivrage automatique pour éviter des cycles de congélation- décongélation.

Procédure du dosage

L'appareil doit être allumé au moins 1 heure avant. Tous les réactifs et les échantillons sont amenés à température ambiante avant utilisation.

Préparation du doage

Les réactifs IMx Hcy et l'échantillon sont ajoutés dans la cartouche-échantillon FPIA et dans la cuvette dans l'ordre suivant :

- Le système aiguille-électrode distribue l'échantillon, la solution de prétraitement, l'enzyme et le tampn de dilution FPIA No.1 dans le puits de prédilution de la cartouche-échantillon ;
- La solution de prétraitement réduit l'Hcy, ses formes disulfures ainsi que les formes mixtes protéine-Hcy présentes dans le plasma ou le sérum en une forme chimique, l'Hcy.
- La S-adénosyl-L-Hcy hydrolaseconvertit l'Hcy en S-adénosyl-L-Hcy (SAH).

- Une partie aliquote du mélange de prédilution, l'anticorps et le tampon de dilution FPIA No.1 sont distribués dans la cuvette et le bruit de fond est mésuré par le système optique FPIA.
- Le traceur, le tampon de dilution FPIA No.1 et une seconde partie aliquote du mélange de prédilution sont transférés dans la cuvette.
- La SAH et le traceur marqué à la fluoreecéine entrent en compétition pour occuper les sites de liaison sur la molécule d'anticorps monoclonal.
- L'intensité de la polarisation de fluorescence est mesurée par le système optique FPIA.

Dosage

Pour le fonctionnement de l'appareil, les logiciels suivants sont nécessaires pour effectuer le dosage :

- Modules système IMx – version 6.0 ou nsupérieure
- Modules Dosages IMx d'exploitation du métabolisme – version 4.0 ou supérieure

Avant d'effectuer le dosage IMx Hcy à l'aide du Module Dosages IMx d'exploitation du métabolisme v4.0, il est nécessaire d'activer le dosage. Sé référer à la table des maitères du manuel technique IMx, afin de trouver les informations de procédure d'activation des dosages.

Les paramètres du dosage IMx Hcy ont déjà été ajustés en usine. Ils peuvent être imprimés, affichés à l'écran et modifiés selon le la procédure décrite au chapitre 6 du manuel technique.

1- Le volume minimum d'échantillon nécessaire pour réaliser le dosage est de 50 µL
2- Le volume minimum de tampon de dilution est de 200 mL ; avant de lancer le dosage, vérifier la présence d'au moins 200 mL de ce tampon de dilution.
3- Identifier les échantillons nécessitant une dilution. Le protocole de dilution doit être effectué uniquement sur des échantillons de concentration supérieure à 50 µmom/L.
4- Charger le carrousel FPIA avec 2 cuvettes ou cartouches- échantillons par échantillon à diluer.
5- Distribuer les échantillons requis.
6- Charger les réactifs.
7- Appuyer sur [**ASSAY**] **[XX**] XX étant le No du dosage [**OTHER**] [**DIL_ALT**] [**STORE**]. Le message **tHCY : #SmpCt TO USE DIL/ALT** s'affiche. On peut égalemement utiliser la procédure de la liste de chargement pour programmer ladilution.
8- Utiliser le clavier numérique pour **saisir le nombre total de cartouches-échantillons qui seront utilisées pour les échantillons dilués** et non pas le nombre d'échantillons à diluer.
9- Appuyer sur [**STORE**]. Pour lancer la dilution :
10- Dans le menu dilution, appuyer sur [**RUN**].

Pour charger un carrousel avec des échantillobns à diluer et des échantillons non dilués, les échantillons non dilués doivent être chargés après les contrôles Hcy, suivis des échantillons à diluer. Ex : s'il faut analyser 3 contrôlesHcy, 4 échantillons non dilués et 2 échantillons à diluer, le carrousel doit être chargé comme suit :

Position 1 à 3 : Contrôle Hcy
Position 4 à 7 : Echantillons non dilués
Position 8 : cartouche-échantillon FPIA1- premier échantillon à diluer
Position 9 : cartouche-échantillon FPIA2- vide
Position 10 : cartouche-échantillon FPIA1- premier échantillon à diluer
Position 11 : cartouche-échantillon FPIA2- vide

Ajouter 11 cuvettes sur le carrousel FPIA. Si l'on utilise le protocole de dilution automatique, l'échantillon doit être pipeté **uniquement dans le puits-échantillon de la première cartouche-échatillon**. L'IMx transférera la quantité d'échantillon appropriée de la cartouche-échantillon 1 à la cartouche- échantillon 2.

L'on peut pratiquer la dilution manuelle, dans ce cas, bien mélanger l'échantillon en le retournant ou le passant au vortex avant de le pipeter dans les puits-échantillon de la cartouche-échantillon. Il est recommandé de faire des dilutions au 1/3. Pour déterminer la concentration en Hcy totale, multiplier la concentration de l'échantillon dilué par le facteur de dilution.

Calcul des résultats

Le dosage IMx Hcy utlise une méthode de traitement des données avec une courbe logistique à 4 paramètres pour obtenir une courbe de calibration.

Pour effectuer une calibration du dosage IMx Hcy, analyser en double toutes les concentrations des calibrateurs Hcy placés dans les 12 premières positions du carrousel, suivies de toutes les concentrations des contrôles Hcy. Le paragraphe « Résultats » fournit une explication sur le type d'ajustement de la courbe utilisée par le dosage IMx Hcy et sur les vérifications spécifiques du dosage utilisées pour déterminer si la courbe est acceptable. **Une fois la calibration du dosage aceptée et mémorisée, tous les dosages sont effectués en MODE 2.**

L'opérateur confirme que les paramètres se trouvent dans les limites acceptables :

Paramètres de dosage	Evaluation des calibrateurs
94.40 MAX SPAN F-A	Calibrateur F- calibrateur A
PERR	RMSE
(Erreur de polarisation)	(Erreur quadratique moyenne)
±2,0	≤ 1,0

La courbe de dosage est stable pendant 2 semaines au minimum.

Pour convertir les résultats en µg/mL, effectuer le calcul suivant : Concentration en µmol/L X 0,1352.

2.1.2. Dosage de l'homocystéine par la technique LC/MS/MS Colonne LC-CN CYANO

Fiche technique

Principe

Les concentrations plasmatiques d'Homocystéine totale sont msurées par la technique de chromatographie liquide haute performance couplée à ladétection par spectrophotométrie de masse.

En présence du dithitréitol, l'Hcy liée aux protéines se trouve sous forme libre. Elle est ensuite extraite en présence d'un standard puis dosée par la technique LC/Masse en mode MRM positif. La technique est linéaire jusqu'à 180 µmol/L. La limite de détection et de quantification est respectivement de 0,05 µmol/L et 0,15 µmol/L.

Prélèvement des échantillons : les échantillons doivent être prélevés chez des individus à jeun.

Préparation de l'échantillon pour analyse

a. Sérum ou plasma : prélever le sang dans untube sec sous vide de 5 ou 10 mL. Si on prélève su sérum, laisser le sang formé un caillot à température ambiante pendant 30 à 60 min. Utiliser de l'EDTA ou à défaut de l'héparine ou du citrate si l'on veut faire une analyse sur le plasma. Centrifuger pendant 10 min et prélever le sérum ou le plasma.

b. Transport des échantillons : le sérum et le plasma soigneusement emballés doivent être transportés congelés du départ à l'arrivée.

c. Conservation des échantillons : Avant analyse, conserver les échantillons entre 2 et 8°C. Si l'on doit garder un échantillon plus de 4 heures, il faut le congeler à -20°C. Ne pas stocker les échantillons dans des congélateurs à dégivrage automatique pour éviter des cycles de congélation- décongélation.

Procédure de dosage

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant utilisation ; mais pour minimiser tout risque de détérioration, éviter de les laisser plus long que nécessaire. Ne jamais mélanger les réactifs provenant différents coffrets, pour un même dosage.

Préparation des réactifs et échantillons

1. Reconstitution des réactifs : standards et contrôles conformément aux prescriptions du fabricant :

- Homocystéine calibration (10 mg dans 5 ml HCl 0,1M) et Hcy D8 standard (10 mg dans 5 mL HCl 0,1M).
- NaOH 10M.
- DTT 500 mM et 100 mM.

2. Reconstituer chaque flacon contrôle (Plasma control Level 1 ref : No. 0072 + II ref : No. 0073 lyophilised) avec 2 ml d'eau distillée HPLC grade, laisser reposer 10 à 15 min jusqu'à dissolution totale.

3. Préparer la gamme d'étalonnage.

4. Préparation de la solution d'extraction : peut se préparer à l'avance et se conserver à 4°C

- Acide formique 50 µL
- Acide Trifluoro acétique 25 µL
- Acétonitrile qsp 50 mL

Dosage

Dans un tube type TREFF

* Echantillon ou point de gamme ou contrôle	100 µL
* SI d'HCY-HCY D8 à 30 µM	100 µlL
* DTT 500 mM	30 µL

Vortexer attendre 15 min à température ambiante, ajouter 200 µl de solution d'extraction ; vortexer, attendre 30 min à 4°C, vortexer 1 min, centrifuger à 14000 g pendant 10 min.

Décanter dans un tube type TREFF, centrifuger à 14000 g pendant 10 min.

Reprendre 100 µl de surnageant en vial ou microplaque (congeler si nécessaire pour passage ultérieur sur masse).

Activation du LC/ MS/MS

Activer le profil (Hardware configuration) : LC+ MS

Ouvrir le projet « Homocystéine »

Créer la liste de travail « Build Acquisition Batc »

Volume d'injection : 2 µL

Méthodes :

- Méthode UPLC acquity : AcquityHCY_cyano_60_0.8_PL. method
- Méthode d'acquisition : HCY_CN_60_0.8_PL.dam
- Méthode de quantification : HCY (noter la date du jour du dosage) ex : 29-07-08.qmf

Pour information, les conditions de ces méthodes sont les suivantes :

UPLC Acquity waters

Solvant A de la phase mobile : Eau + 0,1 % acde formique.

Solvant B de la phase mobile : Acétonitrile + 0,1% acide formique.

Elution isocratique d'un mélange fait automatiquement par l'Acquity Waters : 40% de A ; 60% de B.

Changer l'eau tous les 2 jours pour éviter une prolifération microbienne qui risquerait de boucher les tuyaux.

Solvant fort (strong) : Acétonitrile + 0,1% acide formique.

Solvant faible (weak): Phase mobile.

Solution de rinçage des joints du piston (seal wash) : eau/acétonitrile (+ acide formique) 90/10.

Débit : 0,8 mL/min.

Injection de 2 µL en « partial loop » dans une boucle de 10 µL, cycle d'injection (run time) : 3min.

Limite haute pression : 3000 psi.

Lavage: (Weak: 800 µL/ Strong 400 µL).

Seal wash: 3 min (comme le run).

Température du four: 30°C.

Température de l'injecteur: 10°C.

Hauteur aiguille : 0 mm (mettre à 1 mm s'il existe un précipité).

Avant de passer une série

Adapter la colonne LC-CN Supelco et son porte pré-filtre associé.

En cas de changement de phase mobile :

- équilibrer 1 heure dans l'eau.
- équilibrer 1 heure dans la phase mobile.
- caractériser les volumes de la boucle et de l'aiguille.

Purger.

Equilibrer le système avec la phase mobile « equilibrate ».

Conditionner le système avec un ancien dosage.

NB : Tous les débuts de semaines, faire une purge totale des circuits solvants et seringues.

Calcul des résultats.

Le calcul automatique des résultats des échantillons est fait à partir de la courbe de calibration des standards et une feuille de résultats est imprimée en se servant du clavier numérique de l'ordinateur couplé au système LC/MS/MS.

2.2. Dosage quantitatif et simultané de la vitamine B_{12} et des folates

Fiche technique

Coffret SimulTrac-SNB pour dosage radioimmunogique
Vitamine B12 [^{57}Co] Folates [^{125}I][1] (MP Biomedicals, New York, Etats Unis)

Principe du test

Dans une analyse par compétition, le réactif de liaison doit avoir une affinité égale pour l'étalon et pour la substance présente dans l'échantillon. La vitamine B12 ou les folates non marqués entrent en compétition avec leurs homologues marqués sur le nombre restreint de sites de fixation disponibles sur l'agent de fixation, ce qui réduit la quantité de vitamine B12 ou de folates marqués liés au réactif. Par conséquent, le taux de radioactivité liée est inversement prportionnel à la concentration de l'échantillon du patient ou de l'étalon.

Dans le cas du test radioimmunologique SimulTrac-SNB de MP Biomedicals, les taux de vitamine B12 et de folates sont simultanément déterminés dans un seul tube.

Prélèvement des échantillons : les échantillons doivent être prélevés chez des individus à jeun.

Préparation de l'échantillon pour analyse

a. Sérum ou plasma: prélever le sang dans untube sec sous vide de 5 ou 10 ml. Si on prélève su sérum, laisser le sang formé un caillot à température ambiante pendant 30 à 60 min. Utiliser de l'EDTA si l'on veut faire une analyse sur le plasma. Centrifuger pendant 10 min et prélever le sérum ou le plasma.

b. Hémolysat de sang total (pour dosage des folates érythroctytaires) : Prélever le sang dans untube en verre sous vide de 7 mL contenant de l'EDTA (bouchon lavande). Mesurer et noter la valeur de l'hématocrite. Ajouter 100 µL de sang ensuspension à 2 ml de solution récente d'acide ascorbique à 0,2%. La dilution est alors de 1 pour 21. Renverser plusieurs fois pour bien mélanger ; éviter la formation de mousse; Laisser reposer l'hémolysat entre 20 et 25°C pendant 60 à 90 min avant analyse. Tenir à l'abri de la lumière pendant ce laps de temps.

c. Transport des échantillons: le sérum et le plasma soigneusement emballés doivent être transportés congelés du départ à l'arrivée.

d. Conservation des échantillons: Avant analyse, conserver les échantillons entre 2 et 8°C. Si l'on doit garder un échantillon plus de 4 heures, il faut le congeler à -20°C. Ne pas stocker les échantillons dans des congélateurs à dégivrage automatique pour éviter des cycles de congélation- décongélation.

Procédure du dosage

Si le compteur possède 2 canaux ou plus, il convient de l'étalonner pour compter l'Iode 125 dans un canal et le Cobalt 57 dans un autre. Par contre, si le compteur n'a qu'un seul canal, il faut l'étalonner de façon à ce que les différents réglages du compteur permettent de compter un seul isotope à la fois ; dans ce cas, il faudra passer les tubes 2fois : la première fois, le compteur étant réglé pour l'Iode 125, on obtiendra la coube des folates et les résultats de l'échantillon, et la seonde fois, le compteur éant réglé pour le Cobalt 57, on obtiendra la courbe de la vitamine B12 et les résultats de l'échantillon.

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant utilisation ; mais pour minimiser tout risque de détérioration, éviter de les laisser plus long que nécessaire. Ne jamais mélanger les réactifs provenant différents coffrets, pour un même dosage.

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant.

Préparation des réactifs

1. Si l'on doit utiliser un flacon de marqueur dans les 30 jours, verser le contenu d'un flacon de D thiothréitol (DTT) dans un flacon de marqueur.

2. Il faut ajouter la même quantité de marqueur et de DTT (100 µL de chaque) par tube à doser. On peut également pipetter séparément le marqueur et le DTT (100 µL/tube), en ajoutant d'abord lemarqueur puis le DTT.

Dosage

1. Numéroter 16 tubes pour la courbe étalon. A partir du No. 17, numéroter deux tubes supplémentaires pour chaque échantillon clinique.

2. Ajouter les étalons et les échantillons cliniques suivant les indications données.

3. Ajouter 200 µL de solution active de marquage/DTT (réactif 2A) dans chaque tube, y compris les tubes 1 et 2. Agiter les tubes au vortex.

4. Incuber à temératur ambiante (18- 25°C) pendant 15 min.
5. Ajouter 100 µL de réactif d'extraction aux tubes 3-16 et aux tubes contenant les échantillons. Agiter au votex.
6. Incuber à température ambiante pendant 10 min.
7. Bien agiter le flacon de réactif neutre SimulTrac-SNB. Ajouter 1000 µL de réactif netre aux tubes 3 et 4.
8. Bien agiter le flacon de réactif de liaison SimulTrac-SNB. Ajouter 1000 µL de réactif de liaison aux tubes 5-16 et aux tubes contenant les échantillons. Agiter les tubes au vortex.
9. Incuber les tubes de 3-16 et tous les tubes contenant les échantillons à température ambiante (18-25°C) pendant 60 min à partir du dernier ajout de réactif de liaison. Recouvrir le portoir de papier aluminium pour nprotéger de la lumière, ou le placer dans un endroit sombre.
10. Centrifuger à au moins 1000 X g pendant 10 min, de préférence au frais.
11. Décanter avec précaution, et jeter le surnageant. Retirer la dernière goutte en posant les tubes sur un papier absorbant.
12. Compter la radioactivité dans les pellets (culots) et dans les tubes 1et 2, l'un après l'autre à l'aide d'un compteur gamma. Le nombre de coups total par min pour les tubes 1 et 2 dit se situer entre 10 000 et 25 000 pour le Cobalt 57 et 15 000 et 35 000 pour l'Iode 125, en fonction de l'appareil et de l'âge du marqueur. On peut utiliser un temps de mesure plus court, à cndition que le nombre de coups pour les tubes 1 et 2 soient au moins de 10 000 (nombre de coups total).

Cacul des résultats

Le compteur gamma utilisé est de type COBRA-II™ autogamma (Packard) à double canal.

La courbe pour la vitamine B12 et les résultats sont calculés partir des résultats obtenus par comptage du Cobalt 57 ; la courbe pour les folates et les résultats sont calculés à partir des valeurs obtenes pour le comptage de l'Iode 125.

Les valeurs valeurs de référence sont :

- pour la vitamine B12 : 100 pmol/L
- pour les folates : 7 nmol/L.

2.3. Dosage des Holo-TC sériques par MEIA

Fiche technique

Coffret AxSYM Active-B12 (Abbott)

Principe du test

Le dosage Holo-TC est un dosage immunologique microparticulaire (MEIA). Les microparticules sont recouvertes d'anticorps monoclonaux anti-Holo-TC. L'Holo-TC contenu dans l'échantilon se lie aux microparticules pour former des complexes antigènes-anticorps sur lesparticules. Un conjugué d'anticorps anti-Holo-TC marqué à la pphosphatase alcaline est ajouté et se lie aux complexs antigène-anticorps. La matrice est lavée afin d'éliminer le conjugué non lié. L'addition du substrat, le phosphate de méthyl-4 ombelliferyl génère l'apparition d'un produit fluorescent. Ce dernierest mesuré par le système optique de l'automate.

Prélèvement des échantillons : les échantillons doivent être prélevés chez des individus à jeun.

Préparation de l'échantillon pour analyse

a. Sérum ou plasma: prélever le sang dans untube sec sous vide de 5 ou 10 mL. Si on prélève su sérum, laisser le sang formé un caillot à température ambiante pendant 30 à 60 min. Utiliser de l'EDTA si l'on veut faire une analyse sur le plasma. Centrifuger pendant 10 min et prélever le sérum ou le plasma.

b. Transport des échantillons: le sérum et le plasma soigneusement emballés doivent être transportés congelés du départ à l'arrivée.

c. Conservation des échantillons: Avant analyse, conserver les échantillons entre 2 et 8°C. Si l'on doit garder un échantillon plus de 4 heures, il faut le congeler à -20°C. Ne pas stocker les échatillons dans des congélateurs à dégivrage automatique pour éviter des cycles de congélation- décongélation.

Procédure de dosage

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant utilisation ; mais pour minimiser tout risque de détérioration, éviter de les laisser plus long que nécessaire. Ne jamais mélanger les réactifs provenant différents coffrets, pour un même dosage

Le dosage est réalisé sur l'automate AxSYM (Abbott)

Préparation des réactifs et échantillons

1. Calibrer l'appareil ; placer les réactifs de dilution et de lavage dans l'appareil.
2. La courbe de calibration des standards AxSYM acive B12 et le dosage en double.

Dosage

1. Choisir sur l'appareil le dosage à faire ; grâce au logiciel de pilotage, indiquer le nombre de standards et celui des échantillons à passer.
2. Ouvrir la porte de l'appareil, placer le portoir des standards ; puis le portoir des échantillons identifiés par des codes de barre. Le volume minimal détectable est de 200 µL pour un bon dosage dans les tubes.
3. Après que l'appareil ait accepté, il affiche le temps nécessaire pour finir le dosage.

Calcul des résultats

Le calcul automatique des résultats des échantillons par l'automate AxSYM est fait à partir de la courbe de calibration des standards.

Les valeurs de référence sont : 20 – 120 pmol/L.

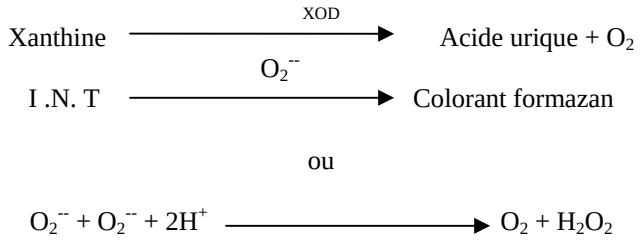
2.4. Dosage de la Superoxyde dismutase (SOD)

Fiche Technique

Coffret RANDOD (Randox Labs., Crumlin, North Ireland)

Principe du test

La SOD est une enzyme intervenant dans la lutte contre les espèces radiculaires oxygénées (ROS, radical oxygen species) et plus particulièrement l'anion superoxyde (O_2^{--}) qui est principalement produit au niveau des membranes mitochondriales lors des transferts d'électron durant la phosporylation oxydative. Le rôle de la SOD est d'accélérer la dismutation du radical superoxyde toxique produit dans les processus oxydatifs, en peroxyde d'hydrogène et en molécule d'oxygène. La méthode utilise la xanthine et la xanthine oxydase (XOD) pour générer des radicaux superoxyde qui réagissent ensuite avec le chlorure de 2-(4-iodophényl-3-(4-nitrophénol)-5-phényltétrazolium (INT) pour former un colorant rouge, le Formazan. L'activité de superoxyde dismutase est mesurée par le degré d'inhibition de la réaction.



Prélèvement des échantillons : les échantillons doivent être prélevés chez des individus à jeun.

Préparation de l'échantillon pour analyse

Utiliser les échantillons de sang total prélevés sur EDTA ou héparine. Il est recommandé de laver les érythrocytes 4 fois avec une solution de NaCl à 0,9%.

- **a.** Centrifuger 0,5 mL de sang total pendant 10 min à 3000 tours/min et enlever le plasma ainsi séparé.
- **b.** Puis laver les érythrocytes 4 fois avec 3 ml de solution NaCl à 0,9%. Chaque lavage doit être suivi d'une centrifugation de 10 min à 3000 tours/min.
- **c.** Compléter les érythrocytes lavés et centrifugés à 2 mL avec de l'eau bidistillée froide ; Mélanger et laisser reposer 15 min à 4°C. Le lysat est dilué avec 0,1 mmol/L de Tampon Phosphate, pH 7,0, de sorte que le % d'inhibition soit compris entre 30% et 60%.

NB : Une dilution au 25ème du lysat esrt recommadée pour les échantillons.

Procédure de dosage

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant utilisation ; mais pour minimiser tout risque de détérioration, éviter de les laisser plus long que nécessaire. Ne jamais mélanger les réactifs provenant différents coffrets, pour un même dosage.

Le dosage est réalisé sur l'automate DELTA PRO.

Préparation des réactifs et échantillons

1. Reconstituer un flacon de substrat Mixte1 avec 20 mL de Tampon 2. Stable pendant 10 jours, conservé entre 2 et 8°C.
2. Le contenu du coffret est prêt à l'emploi ; stable jusqu'à la date de péremption, conservé entre 2 et 8°C.
3. Reconstituer un flacon de Xanthine Oxydase 3 avec 10 mL d'eau bidistillée ; stable pendant 2 semaines, conservé entre 2 et 8°C.
4. Reconstituer n flacon d'étalon 4 avec 10 mL d'eau bidistillée. Les dilutions successives de cet étalon doivent être préparées avec du diluant Randod fourni. Il est conseillé d'effectuer les dilutions à partir de l'étalon 4 pour construire la courbe d'étalonnage. Tous les étalons dilués ainsi sont stables pendant 2 semaines entre 2 et 8°C.

Dosage

La température de dosage dans l'appareil doit être à 37°C.

1. Choisir la longueur d'onde 505 nm.

2. Pipeter dans les tubes identifiés et numérotés
   - étalon 500 µL + 500 µL diluant Ransod + 500 µL substrat.
   - échantillon 500 µL + 500 µL diluant Ransod + 500 µL substrat.
3. Bien mélanger et y ajouter 250 µL dans chaque tube.
4. Bien mélanger au vortex, lire l'absorbance intiale A1 après 30 secs et démarrer le chronomètre simultanément ; lire l'absorbance finale A2 après 3 min.

Calcul

$$\frac{A2 - A1}{3} = \Delta A/\text{min de l'échatillon ou de l'étalon}$$

Diluant puit (S1) = réaction non inhibée = taux X 100%. Tous les taux réactionnels des étalons et des échantillons dilués doivent être convertis en pourcentage du taux réactionnel de S1 puis soustraits à 100% pour donner un pourcentage d'inhibition.

Construire la courbe d'étalonnage sur du papier semi-logarythmique en portant le pourcentage d'inhibition pour chaque étalon sur la partie linéaire en fonction de la concentration de cse étalons (unités SOD/mL).

A partir du pourcentage d'inhibition des échantillons, lire la correspondance en unités SOD sur la courbe d'échantillonnage.

Unités SOD/ mL de sang total = unités SOD/mL de la courbe X facteur de dilution.

2.5. Dosage de la Glutathion Peroxydase (GSH-Px)

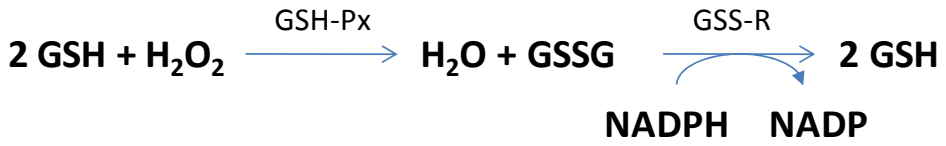
Fiche Technique

Coffret RANDOD (Randox Labs., Crumlin, North Ireland)

Principe du test

Le dosage de l'activité s'effectue selon la méthode décrite par Paglia et Valentine (1967) et utilise les propriétés spectrophotométriques du NADPH, co-substrat de la réaction catalysée par le Glutathion S-réductase, puisque cette enzyme permet la régénération du glutathion oxydé en glutathion réduit.

Le principe est la mesure de l'oxydation de glutathion réduit par H_2O_2, réaction catalysée par la GSH-Px présente dans l'hémolysat. La quantité de GSSG est mesurée par dosage du nombre de microlitres de NADPH oxydé par min par g d'Hb. Cette enzyme qui se trouve dans les globules rouges et le plasma a pour intérêt de détruire les radicaux peroxydes, de débarrasser la cellule des radicaux libres et ainsi de protéger la cellule contre l'oxydation.



Prélèvement des échantillons : les échantillons doivent être prélevés chez des individus à jeun.

Préparation de l'échantillon pour analyse

Utiliser les échantillons de sang total prélevés sur EDTA ou héparine. Il est recommandé de laver les érythrocytes 4 fois avec une solution de NaCl à 0,9%.

a. Centrifuger 0,5 mL de sang total pendant 10 min à 3000 tours/min et enlever le plasma ainsi séparé.

b. Puis laver les érythrocytes 4 fois avec 3 mL de solution NaCl à 0,9%. Chaque lavage doit être suivi d'une centrifugation de 10 min à 3000 tours/min.

c. Compléter les érythrocytes lavés et centrifugés à 2 mL avec de l'eau bidistillée froide ; Mélanger et laisser reposer 15 min à 4°C. Le lysat est dilué avec 0,1 mmol/L de Tampon Phosphate, pH 7,0.

NB : Une dilution au 25ème du lysat est recommadée pour les échantillons.

Procédure de dosage

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant utilisation ; mais pour minimiser tout risque de détérioration, éviter de les laisser plus long que nécessaire. Ne jamais mélanger les réactifs provenant différents coffrets, pour un même dosage.

Le dosage est réalisé sur l'automate DELTA PRO.

Préparation des réactifs et échantillons

1. Reconstituer les réactifs et les conserver entre 2 et 8°C.

2. Le contenu du coffret est prêt à l'emploi ; stable jusqu'à la date de péremption, conservé entre 2 et 8°C.

3. Reconstituer un flacon de Glutathion Peroxydase 3 avec 10 mL d'eau bidistillée ; stable pendant 2 semaines, conservé entre 2 et 8°C.

4. Reconstituer n flacon d'étalon 4 avec 10 mL d'eau bidistillée. Les dilutions successives de cet étalon doivent être préparées avec du diluant Randod fourni. Il est conseillé d'effectuer les dilutions à partir de l'étalon 4 pour construire la courbe d'étalonnage. Tous les étalons dilués ainsi sont stables pendant 2 semaines entre 2 et 8°C.

Dosage

La température de dosage dans l'appareil doit être à 37°C.

1. Choisir la longueur d'onde 340 nm.
2. Pipeter dans les tubes identifiés et numérotés
   - étalon 100 µL + 100 µL de Drabkin + 2600 µL de Tampon phosphate, agiter. Ajouter et agiter ensuite 100µL de NADPH + 10µL GSSGR + 10µL NaN_3 + 100µL GSH.
   - échantillon 100 µL + 100 µL de Drabkin + 2600 µL de Tampon phosphate, agiter. Ajouter et agiter ensuite 100µL de NADPH + 10µL GSSGR + 10µL NaN_3 + 100µL GSH.
3. Effectuer parallèlement un blanc.
4. Bien mélanger au vortex, au moment de lecture : transvaser dans la cuve à silice et ajouter 100µL de la solution H_2O_2. Lire l'absorbance à 340 nm entre la 1ère et la 2è minute.

Calcul

L'unité d'activité glutathion peroxydase est alors définie :

$$\frac{\text{DO(échantillon)} - \text{DO(blanc)} \times 10^{-6}}{4{,}5 \times 10^{-6} \times \text{Hb}^* \times 1\text{mn}} = \frac{\text{DO corrigée} \times 10^{4}}{3 \times \text{Hb \% mL}}$$

Résultats en unité enzymatique

Nombre de micromols de NADPH oxydé par minute par g d'hémoglobine, calculé sur la base de l'absorption d'une mole de NADPH à 340mn :

$$6{,}22 \times 10^{-6{,}14} = 4{,}5 \times 10^{-6}$$

Pour le plasma; le sang est remplacé par par du plasma: 100µL
Résultat en micromoles de NADPH oxydé par minute par litre de plasma.

$$\frac{\text{DO corrigée} \times 10^{-6}}{4{,}5 \times 10^{-6} \times 1\text{mn}} \times \frac{106}{100} = \text{DO corrigée} \times 2222 \ \mu\text{moles/L / mn}$$

2.6. Dosage des apolipoprotéines A1 et B

Fiche technique

Technique immunonéphélémétrique sur le système BN

Principe du test
Les protéines contenues dans les fluides corporels humains forment des complexes immuns avec certains anticorps. Ces complexes dispersent un faisceau lumineux traversant l'échantillon. L'intensité de la lumière dispersée est proportionnelle à la concentration de la protéine dans l'échantillon. Le résultat est évalué par comparaison à un standard de concentration connue.

Prélèvement des échantillons : les échantillons doivent être prélevés chez des individus à jeun.

Préparation de l'échantillon pour analyse

a. Sérum ou plasma : prélever le sang dans untube sec sous vide de 5 ou 10 ml. Si on prélève su sérum, laisser le sang formé un caillot à température ambiante pendant 30 à 60 min. Utiliser de l'héparine si l'on veut faire une analyse sur le plasma. Centrifuger pendant 10 min et prélever le sérum ou le plasma.

b. Transport des échantillons : le sérum et le plasma soigneusement emballés doivent être transportés congelés du départ à l'arrivée.

c. Conservation des échantillons : Avant analyse, conserver les échantillons entre 2 et 8°C. Si l'on doit garder un échantillon plus de 4 heures, il faut le congeler à -20°C. Ne pas stocker les échatillons dans des congélateurs à dégivrage automatique pour éviter des cycles de congélation- décongélation.

Procédure de dosage

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant utilisation ; mais pour minimiser tout risque de détérioration, éviter de les laisser plus long que nécessaire. Ne jamais mélanger les réactifs provenant différents coffrets, pour un même dosage. Pour le dosage, vortexer et centrifuger à 2500 tours/min ; utiliser la partie claire de l'échantillon : elle doit être prélevée à travers la couche de lipides surnageants.

Préparation des réactifs et échantillons
Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Et ne nécessitent aucune préparation supplémentaire

- Antisérum anti apolipoprotéine A1-humaine, ref. OUED
- Antisérum anti apolipoprotéine B humaine, ref. OSAN
- Apolipoprotéine sérum standard (humain), ref. OUPG
- Apoliprotéine de contrôle CHD (humain), ref. OUPH
- Tampon de réaction N, ref. OUMS
- Diluant N, ref. UOMT

Dosage
Les protocoles de dosage sont mentionnés dans le mode d'emploi et le logiciel de l'appareil BN*. Toutes les phases du dosage sont effectuées automatiquement ar le système. Consulter le mode d'emploi du systèmeBN*

1. Les courbes d'étalonnage sont obtenues par étalonnage multipoint. Les dilutions en série du sérum standard sont réalisées automatiquement avec le diluant N.
2. Les échantillons sont automatiquement dilués au 1:20 avec le diluant N, puis mesurés. Les échantillons doivent être mesurés dans les 4 heures suivant leur dilution. Si les résultats sont en dehors du domaine de mesure, le dosage peut être répété après dilution de l'échantillon à un rapport de dilution élevé.

Calcul
L'instrument calcule automatiquement la cncentration d'apolipoprotéine A1 et B en g/L ou dans l'unité sélectionnée par l'utilisateur sur le système BN*, puis il imprime les résultats.

2.7. Dosage de l'insuline par technique radio-immunologique

Fiche Technique

Coffret INSULIN-CT

Principe

Le principe du dosage se repose sur la compétition entre l'insuline marquée à l'Iode 125 et l'insulune contenue dans les standards ou les échantillons à mesurer, vis-à-vis d'un nombre donné et limité de sites anticorps anti-insuline fixés sur la phase solide (tubes revêtus). A la fin de la période d'incubation, l'excès de traceur est aisément élminé par une étape de lavage. La quantité d'insuline marquée liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité d'insuline non marquée présente dans l'essai.

Prélèvement des échantillons : les échantillons doivent être prélevés chez des individus à jeun.

Préparation de l'échantillon pour analyse

a. Sérum ou plasma : prélever le sang dans untube sec sous vide de 5 ou 10 ml. Si on prélève su sérum, laisser le sang formé un caillot à température ambiante pendant 30 à 60 min. Utiliser de l'EDTA ou à défaut de l'héparine ou du citrate si l'on veut faire une analyse sur le plasma. Centrifuger pendant 10 min et prélever le sérum ou le plasma.

b. Transport des échantillons : le sérum et le plasma soigneusement emballés doivent être transportés congelés du départ à l'arrivée.

c. Conservation des échantillons : Avant analyse, conserver les échantillons entre 2 et 8°C. Si l'on doit garder un échantillon plus de 4 heures, il faut le congeler à -20°C. Ne pas stocker les échatillons dans des congélateurs à dégivrage automatique pour éviter des cycles de congélation- décongélation.

Procédure de dosage

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant utilisation ; mais pour minimiser tout risque de détérioration, éviter de les laisser plus long que nécessaire. Ne jamais mélanger les réactifs provenant différents coffrets, pour un même dosage.

Préparation des réactifs et échantillons

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi.

Reconstitution et dilution du traceur : elle doit se faire au moins 30 min avant sa dilution dans la solution tampon

- Reconstituer le traceur avec 5 ml d'eau distillée.
- Reboucher le flacon et mélanger par retournement pour assurer la complète dissolution du produit lyophilisé.
- Transvaser la solution dansun récipient en verre propre de 125 ml.
- Rincer trois fois le flacon de traceur avec la solution Tampon et transférer ces solutions de lavage dans unrécipient.
- Ajouter la solution Tampon restante dans le récipient de 125 ml.
- Homogénéiser doucement.

Dosage

Le dosage nécessite les groupes de tubes suivants :

- Groupe standard T pour la détermination de l'activité totale.
- Groupe standard pour l'établissement de la courbe d'étalonnage.
- Groupe témoin pour les contrôles.
- Groupe Sx pour les échantillons à doser.

Distribuer 100 µl de standards, de contrôle ou d'éhantillons dans les tubes revêtus correspondants.
Ajouter 900 µl de ^{125}I-insuline prédiluée dans les tubes.
Mélanger le contenu de chaque tube au vortex.
Incuber 18 heures à 18-25°C après avoir recouvertles tubes avec un film plastique (parafilm).
Eliminer la solution par aspiration (sauf les tubes T).
Ajouter 4 ml d'eau distillée (sauf les tubes T).
Vider les tubes par aspiration (sauf les tubes T).
Mesurer la radioactivité liée aux tubes revêtus àl'aide d'un scintillateur gamma réglé sur la mesure de l'Iode 125.

Cacul et résultats

Tracer la courbe d'étalonnage des standards.
La concentration en insuline d'une population présumée normale, en utilisant le coffret INSULIN-CT, se situe entre 4,3 et 19,9 µUI/ml.

3. Analyses génétiques

3.1. Extraction de l'ADN génomique du sang

Fiche technique

Kit commercial Bac Nucleon® [1]

Lyse des Globules Rouges

Pipeter 7-10 mL de sang total dans un tube Eppendorf® [2]
Rajouter 4 volumes de réactif A pour 1 volume de sang.
Mélanger 4 minutes à température ambiante.
Centrifuger 5 minutes à 2800 rpm.
Rejeter le surnageant.
Rajouter 1 mL de réactif A.
Mettre dans la glace 5 minutes.
Centrifuger 5 min à 2800 rpm.
Rejeter le surnageant.
Garder le culot.

Destruction des Membranes des Globules Blancs

Rajouter au culot 2 mL du réactif B.
Vortexer jusqu'à dissocier le culot.
Rajouter 500 µL de perchlorate [1]
Agiter par retournement 7 fois.

Elimination des Protéines

Rajouter 2 mL de chloroforme [3]
Agiter par retournement 7 fois.
Rajouter 250 µL de résine [1]
Centrifuger 3 minutes à 2800 rpm.

Récupération de l'ADN

Récupérer la phase supérieure à la résine.
Rajouter 2.5 fois le volume récupéré d'éthanol[4] absolu froid.
Récupérer le filament d'ADN dans un tube Eppendorf® [2]
Eluer l'ADN avec 100 µL de tampon Tris [1]
Agiter.

---

[1] Kit Nucleon Bac 126 3® Ref RPN8512 Amersham-Pharmacia-Biotch. Parc technologique, rue René Razel 91898 Orsay Cedex France [2] Eppendorf, [3] Sigma Ref C-2432, [4] RP Normapur™ Prolabo Ref 20821321

3.2. Génotypage Méthylènetétrahydrofolate réductase

3.2.1 Méthylènetétrahydrofolate réductase 1 et 2 par technique Light Cycler® LC1.2

Fiche Technique

MTHFR** C677T **rs1801133 et MTHFR** A1298C **rs1801131

Amorces [1]

MTHFR 677

Sens = 5' TGGCAGGTTACCCCAAAGG 3' Tm = 60°C
Tm moyenne=59°C
Antisens = 5' TGATGCCCATGTCGGTGC 3' Tm = 58°C

MTHFR 1298

Sens = 5' CTTTTGGGAGCTGAAGGACTACTAC 3' Tm = 74°C
Tm moyenne=71°C
Antisens = 5' CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG 3' Tm = 68°C

Sondes fluorescentes [2]

MTHFR 677

Probe Flu 5’ TGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTCT 3’ Tm = 112°C
Tm moyenne=85°C
Probe Red 5’ CGGGAGCCGATTTCATCAT 3’ Tm = 58°C

MTHFR 1298

Probe Flu 5’ AAG GAG GAG CTG CTG AAG ATG TGG GGG GAG GAG CT 3’ Tm = 112°C
Tm moyenne=88°C
Probe Red 5’ ACC AGT GAA GAA AGT GTC TTT GA 3’ Tm = 64°C

Préparation du mix PCR : Les solutions filles (SF) des amorces et de sondes sont preparées à partir des solutions mères (SM).

	Vol (µl)/capillaire	Concentration finale
H_2O [4]	2.2	
$MgCl_2$ [5] (25mM)	0.8	2 mM
Amorce sens C677T (4 picomol/µl) Amorce anti-sens C677T (4 picomol/µl)	0.5 0.5	0.2 µM 0.2 µM
Amorce sens A1298C (4 picomol/µl) Amorce anti-sens A1298C (4 picomol/µl)	0.5 de SF 0.5 de SF	0.2 µM 0.2 µM
Probe Flu C677T (4 picomol/µl) (SM) Probe Red640 C677T (8 picomol/µl) (SM)	0.5 de SF (SF=1 de SM+24µl H_2O) 0.5 de SF (SF=2 de SM+23 H_2O)	0.2 µM 0.4 µM
Probe Flu A1298C (8 picomol/µl) (SM) Probe Red705 A1298C (8 picomol/µl) (SM)	0.5 de SF (SF=1 de SM+24µl H_2O) 0.5 de SF (SF=2 de SM+23 H_2O)	0.2 µM 0.4 µM
Kit LC hybridization probe [5] (Préparer avec 60 µl de la solution **b** dans la solution **a**)	1	

Déposer 8µl de mix dans chaque capillaire et ajouter ensuite 2µl de DNA (concentration comprise entre 50 et 100 ng /µl par analyse).

Programme d'amplification PCR [6] (F2/F3)

DENATURATION	Type: None		Cycles: 1	
Segment	Temperature (°C)	Time (s)	Pente (°C/s)	Type
1	95	10 : 00	20	None
PCR	Type: Quantification		Cycles: 40	
Segment	Temperature (°C)	Time (s)	Pente (°C/s)	Type
1	95	10	20	None
2	55	5	20	Single
3	72	5	20	None
FUSION CURVE	Type: Melting curves		Cycles: 1	
Segment	Temperature (°C)	Time (s)	Pente (°C/s)	Type
1	95	10	20	None
2	45	20	20	None
3	85	0	0.2	Continuous
COOLING	Type: None		Cycles: 1	
Segment	Temperature (°C)	Time (s)	Pente (°C/s)	Type
1	40	30	20	None

RESULTATS [7] :

Selon les Températures de fusion :

Lecture en F2

MTHFR C677T	Homozygote sauvage	CC	63°C
	Homozygote muté	TT	55°C
	Hétérozygote	CT	55°C+ 64°C

Lecture en F3

MTHFR A1298C	Homozygote sauvage	AA	63°C
	Homozygote muté	CC	60°C
	Hétérozygote	AC	61°C

[1] Synthétisées dans le Secteur Commun de Biologie Moléculaire ou par la société Tib MolBiol. Syntherselabor GmbH. D-12103, Berlin, Germany.
[2] Tib MolBiol, Syntherselabor GmbH, D-12103, Berlin, Germany.
[3] H_2O PCR Grade, Réf. 03315932. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[4] LC capillaries 20µl. Réf. 11909339. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[5] LC Fast Start Hyb Pr. Rèf. 12239272. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[6] Light Cylcler®. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[7] Calibration tous les 6 mois par le kit Color Compensation Set Réf. 2158850. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

Technique en Light Cycler®, modifiée de Nakamura et al., 2002

3.2.2 Méthylènetétrahydrofolate réductase 1 par technique Light Cycler® LC480

Fiche Technique

MTHFR** C677T **rs1801131

Amorces [1]

MTHFR C677T

Sens = 5' TGGCAGGTTACCCCAAAGG 3'
Antisens = 5' TGATGCCCATGTCGGTGC 3'

Sondes fluorescentes [2]

MTHFR C 677T

Probe Flu 5' TGA GGC TGA CCT GAA GCA CTT GAA GGA GAA GGT GTC T 3' FL
Probe Red 640 5' CGG GAG CCG ATT TCA TCA T 3' P

Préparation du mix: Les solutions filles (SF) des amorces et de sondes sont preparées à partir des solutions mères (SM).

	Volume (µl/puits de 96)	Volume (µl/puits de 384)	Concentration finale	(Nbre de puits + 1)[3] (Nbre de puits + 16)[4]
H2O[5]	**2, 75**	**1,72**		
Amorce sens C677T (4picomol/µl) SM	**1,25 SF** (SF=4µl de SM + 96µlH_2O)	**0,79 SF** (SF=4µl de SM + 96µlH_2O)	0,5 µM	
Amorce antisens C677T (4 picomol/µl) SM	**1,25 SF** (SF=4µl de SM + 96µlH_2O)	**0,79 SF** (SF=4µl de SM + 96µlH_2O)	0,5 µM	
Probe Flu C677T (4 picomol/µl) (SM)	**0,5 SF** (SF=2µl de SM + 48µlH_2O)	**0,32 SF** (SF=2µl de SM + 48µlH_2O)	0,2 µM	
Probe Red640 C677T (8picomol/µl) (SM)	**0,25 SF** (SF=4µl de SM + 46µlH_2O)	**0,16 SF** (SF=4µl de SM + 46µlH_2O)	0,2 µM	
Kit LC 480 genotyping 5X[5] (pret à l'emploi)	**2**	**1,25**	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA pour la plaque 96.
Déposer 5 µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 1 µl de DNA pour la plaque 384.
La concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/µl par analyse).
Filmer la plaque et centrifuger à 1500g (2730rpm) pendant 2mn.

Programme d'amplification PCR[6] : 1 H 15 environ.

Detection format : **Multi Color HybProbe ou Monocolor HybProbe si MTHFR1 seule** (Selected Filter Combinations : **483-640**)			Reaction volume : **6µl**[8] Reaction volume : **10 µl**[7]	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s)[9] = Pente	Ramp Rate (°C/s)[10] = Pente
DENATURATION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
95	None	00 :10 :00	4.4	4.8
PCR	Cycles : **45**	Analysis Mode :	**Quantification**	**Quantification**
95	None	00 :00 :10	4.4	4.8
55	Single	00 :00 :10	2.2	2.5
72	None	00 :00 :10	4.4	4.8
COURBES DE FUSION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**Melting curves**	**Melting curves**
95	None	00 :00 :30	4.4	4.8
40	None	00 :02 :00	2.2	2.5
73	Continuous			
REFROIDISSEMENT Cycles : **1**		Analysis Mode :	**None**	**None**
40	None	00 :00 :30	2.2	2.5

Résultats :

MTHFR 1	**Génotypage**	**Températures de fusion (Tm)**
Homozygote sauvage	CC	63°C
Homozygote muté	TT	52°C
hétérozygote	CT	52°C+64°C

[1]Amorces Eurogentec.Eurogentec SA Liège science park, rue Bois Saint-Jean 54102 Seraing Belgique

[2]Tib MolBiol, Syntherselabor GmbH, D-12103, Berlin, Germany.
[3]Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 96 puits
[4] Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 384 puits
[5]LightCycler480 Genotyping Master 5X concentré Cat. 04 707 524 001 Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France
[6]Light Cylcler480. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[7]Volume par puits pour plaque 96 puits.
[8]Volume par puits pour plaque 384 puits.
[9]Pente de courbe de fusion pour plaque 96 puits.
[10]Pente de courbe de fusion pour plaque 384 puits.

Technique en Light Cycler480 mise au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CHU-Brabois.

3.2.3. Méthylènetétrahydrofolate réductase 2 par technique Light Cycler® LC480

Fiche Technique

MTHFR *A1298C* ***rs1801133***

Amorces [1]

MTHFR A1298C

Sens = 5' CTT TTG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C 3'
Antisens = 5' CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG 3'

Sondes fluorescentes [2]

MTHFR A 1298C

Probe Flu 5' AAG GAG GAG CTG CTG AAG ATG TGG GGG GAG GAG CT 3'FL
Probe Red 610 5' ACC AGT GAA GAA AGT GTC TTT GA 3' PH

Préparation du mix: Les solutions filles (SF) des amorces et de sondes sont preparées à partir des solutions mères (SM).

	Volume (µl/puits de 96)	Volume (µl/puits de 384)	Concentration finale	(Nbre de puits + 1)[3] (Nbre de puits + 16)[4]
H2O[5]	**2, 75**	**1,72**		
Amorce sens A1298C (4picomol/µl) SM	**1,25 SF** (SF=4µl de SM + 96µlH_2O)	**0,79 SF** (SF=4µl de SM + 96µlH_2O)	0,5 µM	
Amorce antisens A1298C (4 picomol/µl) SM	**1,25 SF** (SF=4µl de SM + 96µlH_2O)	**0,79 SF** (SF=4µl de SM + 96µlH_2O)	0,5 µM	
Probe Flu A1298C (4 picomol/µl) (SM)	**0,5 SF** (SF=2µl de SM + 48µlH_2O)	**0,32 SF** (SF=2µl de SM + 48µlH_2O)	0,2 µM	
Probe Red610 A1298C (8picomol/µl) (SM)	**0,25 SF** (SF=4µl de SM + 46µlH_2O)	**0,16 SF** (SF=4µl de SM + 46µlH_2O)	0,2 µM	
Kit LC 480 genotyping 5X[5] (pret à l'emploi)	**2**	**1,25**	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA pour la plaque 96.
Déposer 5 µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 1 µl de DNA pour la plaque 384.
La concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/µl par analyse**).**
Filmer la plaque et centrifuger à 1500g (2730rpm) pendant 2mn.

Programme d'amplification PCR[6] : 1 H 15 environ.

Detection format : **Multi Color HybProbe ou Monocolor HybProbe si MTHFR2 seule** (Selected Filter Combinations : **483-610**)			Reaction volume : **6µl**[8] Reaction volume : **10 µl**[7]	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s)[9] = Pente	Ramp Rate (°C/s)[10] = Pente
DENATURATION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
95	None	00 :10 :00	4.4	4.8
PCR	Cycles : **45**	Analysis Mode :	**Quantification**	**Quantification**
95	None	00 :00 :10	4.4	4.8
55	Single	00 :00 :10	2.2	2.5
72	None	00 :00 :10	4.4	4.8
COURBES DE FUSION	Cycles : **1**	**A**nalysis Mode :	**Melting curves**	**Melting curves**
95	None	00 :00 :30	4.4	4.8
40	None	00 :02 :00	2.2	2.5
73	Continuous			
REFROIDISSEMENT	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
40	None	00 :00 :30	2.2	2.5

Résultats :

MTHFR 2	**Génotypage**	**Températures de fusion (Tm)**
Homozygote sauvage	AA	59°C
Homozygote muté	CC	56°C
hétérozygote	AC	56°C+59°C

[1]Amorces Eurogentec.Eurogentec SA Liège science park, rue Bois Saint-Jean 54102 Seraing Belgique

[2]Tib MolBiol, Syntherselabor GmbH, D-12103, Berlin, Germany.
[3]Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 96 puits.
[4] Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 384 puits.
[5]LightCycler480 Genotyping Master 5X concentré Cat. 04 707 524 001 Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[6]Light Cylcler480. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[7]Volume par puits pour plaque 96 puits.
[8]Volume par puits pour plaque 384 puits.
[9]Pente de courbe de fusion pour plaque 96 puits.
[10]Pente de courbe de fusion pour plaque 384 puits.

Technique en Light Cycler480 mise au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CHU-Brabois.

3.3. Génotypage de la méthionine synthase

3.3.1. Génotypage de la méthionine synthase par technique en Light Cycler® LC1.2

Fiche Technique

MTR** A2756G **rs1805087

Amorces [1]

Sens MTR1 = 5' TATGGCTATCTTGCATTTTCA G 3' Tm = 60°C

Tm moyenne=58°C

Antisens MTR2 = 5' TTTACACTCCTCAAAACCATT 3' Tm = 56°C

Sondes fluorescentes [2]

Probe Flu = 5'AGACTCATAATGGCCCTGTCTATAT 3' Tm = 72°C

Tm moyenne=85°C

Probe Red 640 = 5'TCATATTCTTCCATGATTTCCTCAAAGTATTCATCCT3' Tm = 98°C

	Vol (µl/capillaire)	Concentration finale	X (Nb de capillaires [3]+ 1)
H_2O [4]	3.2		
$MgCl_2$ [5] (25mM)	0.8	2mM	
Amorce sens (5picomol/µl)	1	0.5µM	
Amorce antisens (5picomol/µl)	1	0.5µM	
Probe Flu (4picomol/µl) (SM)	0.5 SF (SF=1 de SM+24µL H_2O)	0.2µM	
Probe Red 640 (8picomol/µl)	0.5 SF (SF= de 2 SM +23 µL H_2O)	0.4µM	
Kit LC hybridization probe [5] (Préparer avec 60 µl de la solution **b** dans la solution **a**)	1		

Déposer 8µl de mix dans chaque capillaire et ajouter ensuite 2µl de DNA (concentration comprise entre 50 et 100 ng/l par analyse)

Programme d'amplification PCR [6] (Programme : F2/F1).

DENATURATION	Type : None		Cycles : 1	
Segment	Temperature (°C)	Time (s)	Pente (°C/s)	Type
1	95	10 :00	20	None
PCR	Type : Quantification		Cycles : 40	
Segment	Temperature (°C)	Time (s)	Pente (°C/s)	Type
1	95	10	20	None
2	50	5	20	Single
3	72	10	20	None
FUSION CURVE	Type : Melting curves		Cycles : 1	
Segment	Temperature (°C)	Time (s)	Pente (°C/s)	Type
1	95	5	20	None
2	45	10	20	None
3	95	0	0.1	Continuous
COOLING	Type : None		Cycles: 1	
Segment	°C.	Temp en sec.	Pente (°C/sec.)	Type
1	40	30	20	None

RESULTATS :

Selon la température de fusion

Homozygote sauvage	AA	56 °C
Homozygote muté	GG	62 °C
Hétérozygote	AG	56 °C+62 °C

[1] Synthétisées dans Secteur Commun de Biologie Moléculaire ou par la société Tib MolBiol, Syntherselabor GmbH, D-12103, Berlin, Germany.
[2] Tib MolBiol, Syntherselabor GmbH, D-12103, Berlin, Germany.
[3] H_2O PCR Grade. Réf. 03315932. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[4] LC capillaries 20µl. Réf. 11909339. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[5] LC Fast StartHyb Probes. Rèf. 12239272. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[6] Light Cylcler®. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.

Technique en Light Cycler® mise au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CHU-Brabois

3.3.2. Génotypage de la méthionine synthase par technique en Light Cycler® LC480

Fiche Technique

MTR** A2756G **rs1805087

Amorces [1]

Sens MTR1 **A2756G** = 5' TATGGCTATCTTGCATTTTCA G 3'
Antisens MTR2 **A2756G** = 5' TTTACACTCCTCAAAACCATT 3'

Sondes fluorescentes [2]

Probe Flu **A2756G** = 5'AGACTCATAATGGCCCTGTCTATAT 3' FL

Probe Red 640 **A2756G** = 5'TCATATTCTTCCATGATTTCCTCAAAGTATTCATCCT3'

Préparation du mix: Les solutions filles (SF) des amorces et de sondes sont preparées à partir des solutions mères (SM).

	Volume (µl/puits de 96)	Volume (µl/puits de 384)	Concentration finale	(Nbre de puits + 1)[3] (Nbre de puits + 16)[4]
Amorce sens A2756G (5picomol/µl) SM	**1 SF** (SF=5µl de SM + 95µlH_2O)	**0,63 SF** (SF=5µl de SM + 95µlH_2O)	0,5 µM	
Amorce antisens A1298C (4 picomol/µl) SM	**1 SF** (SF=5µl de SM + 95µlH_2O)	**0,63 SF** (SF=5µl de SM + 95µlH_2O)	0,5 µM	
Probe Flu A1298C (4 picomol/µl) (SM)	**0,5 SF** (SF=2µl de SM + 48µlH_2O)	**0,32 SF** (SF=2µl de SM + 48µlH_2O)	0,2 µM	
Probe Red610 A1298C (8picomol/µl) (SM)	**0,5 SF** (SF=4µl de SM + 46µlH_2O)	**0,32 SF** (SF=4µl de SM + 46µlH_2O)	0,4 µM	
Kit Mix Probe Master LC 480 2X[5] (pret à l'emploi)	**5**	**3,13**	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA pour la plaque 96.
Déposer 5 µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 1 µl de DNA pour la plaque 384.
La concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/µl par analyse).
Filmer la plaque et centrifuger à 1500g (2730rpm) pendant 2mn.

Programme d'amplification PCR[6] : 2 H environ.

Detection format : **Multi Color HybProbe ou Monocolor HybProbe MTR A2756G (MS)** (Selected Filter Combinations : **483-640**)			Reaction volume : **6µl**[8] Reaction volume : **10 µl**[7]	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s)[9] = Pente	Ramp Rate (°C/s)[10] = Pente
DENATURATION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
95	None	00 :10 :00	4.4	4.8
PCR	Cycles : **50**	Analysis Mode :	**Quantification**	**Quantification**
95	None	00 :00 :10	4.4	4.8
50	Single	00 :00 :15	2.2	2.5
72	None	00 :00 :15	4.4	4.8
COURBES DE FUSION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**Melting curves**	**Melting curves**
95	None	00 :00 :20	4.4	4.8
45	None	00 :02 :00	2.2	2.5
70	Continuous			
REFROIDISSEMENT	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
40	None	00 :00 :30	2.2	2.5

Résultats :

MTR A2756G (MS)	**Génotypage**	**Températures de fusion (Tm)**
Homozygote sauvage	AA	55°C
Homozygote muté	GG	61°C
hétérozygote	AG	55°C+61°C

[1]Amorces Eurogentec.Eurogentec SA Liège science park, rue Bois Saint-Jean 54102 Seraing Belgique.

[2]Tib MolBiol, Syntherselabor GmbH, D-12103, Berlin, Germany.
[3]Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 96 puits.
[4] Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 384 puits.
[5]LightCycler480 Probes Master 2X concentré Cat. 04 707 494 001 Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[6]Light Cylcler480. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[7]Volume par puits pour plaque 96 puits.
[8]Volume par puits pour plaque 384 puits.
[9]Pente de courbe de fusion pour plaque 96 puits.
[10]Pente de courbe de fusion pour plaque 384 puits.

Technique en Light Cycler480 mise au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CHU-Brabois.

3.4. Génotypage Méthionine Synthase Réductase

3.4.1 Génotypage Méthionine Synthase Réductase par technique RFLP

Fiche Technique

MTRR** A66G **rs1801304

Amorces [1]

Sens MTRR1 = 5' GCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT 3' Tm = 72°C.
Antisens MTRR2 = 5 'GTGAAGATCTGCAGAAAATCCATGTA 3' Tm = 70°C

Préparation du mix PCR (QSP 50µl)

	Vol (µl/tube)	Concentration finale
DNA 250 ng/µl	1	250 ng
Tampon PCR 10X [2]	5	1 X
$MgCl_2$ 50 mM [2]	2	2 mM
dNTP 1.25 mM [3]	1	0.02 mM
Amorce sens MTRR1 10µM	4	0.8µM
Amorce antisens MTRR2 10µM	4	0.8 µM
Hot Start TaqDNA 5U/µl [2]	0.4	2 U
H_2O [4]	32.6	

Programme d'amplification PCR [5]

	Température (°C)	Temps (min)
Dénaturation initiale	95	15
30 cycles		
	Température (°C)	Temps (sec)
Dénaturation	96	30
Hybridation	60	35
Elongation	72	60
	Température (°C)	Temps (min)
Elongation	72	7

Electrophorèse

Dépôt de 10 µl sur gel d'agarose [6] à 2 % et migration [7] à 130 V [8] pendant 1h.

Préparation de la digestion [9]

	µl
Produit de PCR	8
H_2O [4]	8
Tampon Enzyme [10]	2
Enzyme de restriction [10] NdeI 5U/µl	2

Incubation à 37 °C pendant 4h.

Electrophorèse

Dépôt de 20 µl sur gel de polyacrylamide [11] à 8%
Migration[12] 100 V [8] pendant 1h dans TBE [13] 1X

Résultats [14, 15]

		Nb de paires de bases
Homozygote sauvage	AA	44 - 22
Homozygote muté	GG	66
Hétérozygote	AG	66 - 44 - 22

[1] Synthétisées dans le Secteur Commun de Biologie Moléculaire CHU Brabois
[2] Kit QIAGEN Ref. 203203. QIAGEN S.A. 3, av du Canada LP 809 91974 Courtaboeuf, Cedex, France
[3] Réf. Dntp 100mM : mélange dATP, dCTP, dGTP, et dTTP. Prendre 12.5 L de chaque solution et ajouter 950 L de H_2O milliQ Sigma Aldrich BP 701, 38297 St Quentin Fallavier Cedex, France
[4] préparée au CHU Brabois
[5] thermocycleur : PCR System 2400, Perkin Elmer, Applied Biosystems ; ZAC Paris Nord II, BP 50086, 95948 Roissy CDG, Cedex, France
[6] Agarose Electrophoresis grade 100 g, Réf. 315510-019, Invitrogen Sarl, BP 96, 95613 Cergy Pontoise, Cedex, France
[7] Cuves: Sub-Cell® GT Agarose Gel. BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA
[8] Generateur: PowerPac™ . BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA
[9] Bain Marie: Lauda E 100
[10] Enzyme de restriction + Tampon ; Réf. RO111S 20000 U/ml. Ozyme, Biolab, BP 78053, St Quentin Yveline, Cedex, France
[11] (4 ml de polyacrylamide 30%BIORAD ref.161-0156 + 1.5ml de TBE 10X + 150µl de persulfate d'ammonium 10% + 15 µl de Temed + H_2O QSP 15ml)
[12] Cuves: Mini Proton ® 3. Electrophoresis Cell, BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA
[13] Eurobio, 91953 Les Ulis, France
[14] UVP Dual Intensity Transilluminator
[15] Gel Doc Scanner, BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA

Technique mise au point au laboratoire

3.4.2. Génotypage Methionine Synthase Reductase par technique en Light Cycler LC480

Fiche Technique

MTRR** A66G **rs1801394

Amorces [1]

Sens MTRR1 **A66G** 5' GCA AAG GCC ATC GCA GAA GAC AT 3'

Antisens MTRR2 **A66G** 5'GTG AAG ATC TGC AGA AAA TCC ATG TA 3'

Sondes fluorescentes [2]

Probe Flu **A66G** 5' CCA CAG CTT GCT CAC ACA TTT C 3'

Probe Red 640 **A66G** 5' CTG CGA TGG CCT TTG CCT GTC CCT 3'

Préparation du mix: Les solutions filles (SF) des amorces et de sondes sont preparées à partir des solutions mères (SM).

	Volume (µl/puits de 96)	Volume (µl/puits de 384)	Concentration finale	(Nbrede puits+1)[3] (Nbredepuits+ 16)[4]
H2O[5]	**3**	**1,875**		
Amorce sens A66G (5picomol/µl) SM	**1 SF** (SF=5µl de SM+195µlH_2O)	**0,625 SF** (SF=5µldeSM+195µl H_2O)	0,5 µM	
Amorce antisens A66G (5picomol/µl) SM	**1 SF** (SF=5µl de SM + 195 µl H_2O)	**0,625 SF** (SF=5µl de SM + 195 µl H_2O)	0,5 µM	
Probe Flu A66G (4 picomol/µl) (SM)	**0,5 SF** (SF=2µl de SM + 48 µl H_2O)	**0,32 SF** (SF=2µl de SM + 48 µl H_2O)	0,2 µM	
Probe Red640 A66G (8picomol/µl) (SM)	**0,5 SF** (SF=4µl de SM + 46 µl H_2O)	**0,32 SF** (SF=4µl de SM + 46 µl H_2O)	0,2 µM	
Kit LC 480 genotyping 5X[5] (pret à l'emploi)	**2**	**1,25**	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA pour la plaque 96.
Déposer 5 µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 1 µl de DNA pour la plaque 384.
La concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/µl par analyse).
Filmer la plaque et centrifuger à 1500g (2730rpm) pendant 2mn.

Programme d'amplification PCR[6] : 1 H 50 environ

Detection format : **Multi Color HybProbe ou Monocolor HybProbe MTRR A66G (MSR)** (Selected Filter Combinations : **483-640**)			Reaction volume : **6µl**[8] Reaction volume : **10 µl**[7]	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s)[9] = Pente	Ramp Rate (°C/s)[10] = Pente
DENATURATION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
95	None	00 :10 :00	4.4	4.8
PCR	Cycles : **50**	Analysis Mode :	**Quantification**	**Quantification**
95	None	00 :00 :10	4.4	4.8
50	Single	00 :00 :15	2.2	2.5
72	None	00 :00 :15	4.4	4.8
COURBES DE FUSION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**Melting curves**	**Melting curves**
95	None	00 :00 :20	4.4	4.8
45	None	00 :03 :00	2.2	2.5
70	Continuous			
REFROIDISSEMENT	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
40	None	00 :00 :30	2.2	2.5

Résultats :

MTRR A66G (MSR)	Génotypage	Températures de fusion (Tm)
Homozygote sauvage	AA	57°C
Homozygote muté	GG	62°C
hétérozygote	AG	57°C+62°C

[1]Amorces Eurogentec.Eurogentec SA Liège science park, rue Bois Saint-Jean 54102 Seraing Belgique.

[2]Tib MolBiol, Syntherselabor GmbH, D-12103, Berlin, Germany.
[3]Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 96 puits.
[4] Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 384 puits.
[5]LightCycler480 Genotyping Master 5X concentré Cat. 04 707 524 001 Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[6]Light Cylcler480. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[7]Volume par puits pour plaque 96 puits.
[8]Volume par puits pour plaque 384 puits.
[9]Pente de courbe de fusion pour plaque 96 puits.
[10]Pente de courbe de fusion pour plaque 384 puits.

Technique en Light Cycler480 mise au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CHU-Brabois.

3.5. Génotypage de la transcobalamine II

3.5.1. Génotypage de la transcobalamine II par technique RFLP

Fiche Technique

TCN** C776G* - Codon 259 ***rs1801198

Amorces [1]

Sens CAS =	CTC ATG ACT TCC CCC ATG CC	Tm = 64 °C.
Sens SIS =	CTC ATG ACT TCC CCC ATG CG	Tm = 64 °C.
Antisens ERGE =	TGC CAG ACA GTC TGG GAA GA	Tm = 62 °C.

Préparation du mix PCR (QSP 50 µl)

	Vol (µl/tube)	Concentration finale
DNA 250 ng/µl	1	250 ng
Tampon PCR 10X [2]	5	1 X
$MgCl_2$ 50 mM [2]	2	2 mM
dNTP 1.25 mM [3]	8	0.2 mM
Amorce sens **CAS ou SIS** 10µM	0.75	0.2 µM
Amorce antisens **ERGE** 10µM	0.75	0.2 µM
TaqDNA 5 U/µl [2]	0.25	1.25 U
H_2O [4]	32.25	

Programme d'amplification PCR [5] :

1 cycle		
	Température (°C)	Temps (min)
Dénaturation initiale	94	2
30 cycles		
	Température (°C)	Temps (sec)
Dénaturation	94	20
Hybridation	60	20
Elongation	72	20
1 cycle		
	Température (°C)	Temps (min)
Elongation	72	7

Electrophorèse

Dépôt de 10 µl sur gel d'agarose [6] à 1.5 % + 3 µl de gel loading solution [7]

Migration [8] : 130 V [9] pendant 1h.dans TBE [10] 1X

Résultats [11,12]

Taille attendue du fragment: 177 pb.

	primer 5WT	primer 5M
homozygote Proline - sauvage	1 bande	-
homozygote Arginine - muté	-	1 bande
hétérozygote Proline / Arginine	1 bande	1 bande

[1] Synthétisées dans le Secteur Commun de Biologie Moléculaire CHU Brabois.
[2] Kit 18038-026. Invitrogen Sarl, BP 96, 95613 Cergy Pontoise, Cedex, France.
[3] Réf. dNTP100mM : mélange dATP, dCTP, dGTP, et dTTP. Prendre 12.5 L de chaque solution et ajouter 950 L de H_2O milliQ Sigma .Aldrich BP 701, 38297 St Quentin Fallavier Cedex, France.
[4] Préparée au CHU Brabois.
[5] Thermocycleur : PCR System 2400, Perkin Elmer, Applied Biosystems ; ZAC Paris Nord II, BP 50086, 95948 Roissy CDG, Cedex, France.
[6] Agarose Electrophoresis grade 100g, Réf. 315510-019, Invitrogen Sarl, BP 96, 95613 Cergy Pontoise, Cedex, France.
[7] Gel Loading Réf. G2526. Sigma Aldrich BP 701, 38297 St Quentin Fallavier Cedex, France.
[8] Cuves: Sub-Cell® GT Agarose Gel. BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA.
[9] Generateur: PowerPac™ . BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA.
[10] Eurobio. 91953 Les Ulis, France.
[11] UVP Dual Intensity Transilluminator.
[12] Gel Doc Scanner. BioRad, Life Science Group, Hercules California 94547, USA.

Polymorphisme mis en évidence à l'unité INSERM U-724 (Namour F et al. 1998).

3.5.2. Génotypage de la transcobalamine II par Technique en Light Cycler® LC480

Fiche Technique

TCN** C776G* - Codon 259 ***rs1801198

Amorces [1]

Sens CAS =	3' CTC ATG ACT TCC CCC ATG CC 5'	Tm = 64 °C.
Sens SIS =	3' CTC ATG ACT TCC CCC ATG CG 5'	Tm = 64 °C.
Antisens ERGE =	3' TGC CAG ACA GTC TGG GAA GA 5'	Tm = 62 °C.

Préparation du mix: Les solutions filles (SF) des amorces sont preparées à partir des solutions mères (SM)

	Vol (µl/puits de 96)	Vol (µl/puits de 384)	Concentrat° finale	Mix1 CAS Nbre de puits+1[2] Nbredepuits+16[3]	Mix2 SIS Nbredepuits+1[2] Nbredepuits+16[3]
H_2O[4]	**2**	**1,25**			
Amorce Sens CAS (3picomol/µl) SM	**0,5 SF** SF=1,2µlde SM500µM+ 198,8µlH_2O	**0,32 SF** SF=1,2µlde SM500µM+ 198,8µlH2O	0,15 µM		
Amorce Sens SIS (3picomol/µl) SM	**0,5 SF** SF=1,2µlde SM500µM+ 198,8µlH_2O	**0,32 SF** SF=1,2µlde SM500µM+ 198,8µlH2O	0,15 µM		
Amorce Antisens ERGE (3picomol/µl) SM	**0,5 SF** SF=1,2µlde SM500µM+ 198,8µlH_2O	**0,32 SF** SF=1,2µlde SM500µM+ 198,8µlH2O	0,15 µM		
Kit LC480 Sybr Green 2X[4] (Prêt à l'emploi)	**5**	**3,2**	1X		

Déposer 8µl de MIX1 dans chaque puits impair et 8µl de MIX2 dans chaque puits pair et ajouter ensuite 2µl du même DNA dans les 2 puits consécutifs pour la plaque 96(ex : A1 et A2 ; A3et A4).
Déposer 5 µl de MIX1dans chaque puits impair et 5 µl de MIX2dans chaque puits pair et ajouter ensuite 1 µl du même DNA dans les puits consécutifs pour la plaque 384(ex : A1 et A2 ; A3et A4).
La concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/µl par analyse)
Filmer la plaque et centrifuger à 1500g (2730rpm) pendant 2mn.

Programme d'amplification PCR[5] : 1H environ

Detection format : **SYBR Green** ***TCN*** *C776G* **- Codon 259 rs1801198** (Selected Filter Combinations : **483-533**)			Reaction volume : **6µl**[6] Reaction volume : **10 µl**[7]	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s)[8] = Pente	Ramp Rate (°C/s)[9] = Pente
DENATURATION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
95	None	00 :10 :00	4.4	4.8
PCR	Cycles : **35**	Analysis Mode :	**Quantification**	**Quantification**
95	None	00 :00 :10	4.4	4.8
61	None	00 :00 : 10	2.2	2.5
72	Single	00 :00 :14	4.4	4.8
COURBES DE FUSION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**Melting curves**	**Melting curves**
95	None	00 :00 :01	4.4	4.8
68	None	00 :01 :00	2.2	2.5
95	Continuous			
REFROIDISSEMENT	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
40	None	00 :00 :30	2.2	2.5

[1]Amorces Eurogentec.Eurogentec SA Liège science park, rue Bois Saint-Jean 54102 Seraing Belgique

[2]Nbre d'échantillons à considérer pour le MIX1 ou MIX2 pour une plaque de 96 puits
[3]Nombre d'échantillons à considerer pour le MIX1 ou MIX2 pour une plaque de 384 puits
[4]Light Cycler480 SYBR Green I Master Cat 04 707 516 001 Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[5]Light Cylcler480. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[6]Volume par puits pour plaque 384 puits
[7]Volume par puits pour plaque 96 puits
[8]Pente de courbe de fusion pour plaque 96 puits
[9]Pente de courbe de fusion pour plaque 384 puits

Technique en Light Cycler480 mise au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CHU-Brab

3.6. Génotypage de *Tumor Necrosis Factor-α* par technique en Light Cycler® LC480

Fiche Technique

TNF-α** G-308A **rs1800629

Amorces [1]

Sens **G-308A** 5' AAG GAA ACA GAC CAC AGA CCT G 3'
Antisens **G-308A** 5'GGT CTT CTG GGC CAC TGA C 3'

Sondes fluorescentes [2]

Probe Sensor Flu **G-308A** 5' AAC CCC GTC CCC ATG CCC C 3' FL
Probe Anchor LCRed 640 **G-308A** 5' CAA AAC CTA TTG CCT CCA TTT CTT TTG GGG AC PH

Préparation du mix: Les solutions filles (SF) des amorces et de sondes sont preparées à partir des solutions mères (SM).

	Volume (µl/puits de 96)	Volume (µl/puits de 384)	Concentration finale	(Nbre de puits + 1)[3] (Nbre de puits + 16)[4]
H2O[5]	**3**	**1,875**		
Amorce sens G-308A (5picomol/µl) SM	**1 SF** (SF=5µl deSM+195 µl H_2O)	**0,625 SF** (SF=5µl deSM+195µl H_2O)	0,5 µM	
Amorce antisens G-308A (5picomol/µl) SM	**1 SF** (SF=5µl deSM+195µl H_2O)	**0,625 SF** (SF=5µl de SM + 195 µl H_2O)	0,5 µM	
Probe Sensor Flu G-308A (4 picomol/µl) (SM)	**0,5 SF** (SF=2µl de SM + 48µl H_2O)	**0,32 SF** (SF=2µl de SM + 48 µl H_2O)	0,2 µM	
Probe Anchor Red640 G-308A (8picomol/µl) (SM)	**0,5 SF** (SF=4µl de SM + 46µl H_2O)	**0,32 SF** (SF=4µl de SM + 46 µl H_2O)	0,2 µM	
Kit LC 480 genotyping 5X[5] (pret à l'emploi)	**2**	**1,25**	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA pour la plaque 96.
Déposer 5 µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 1 µl de DNA pour la plaque 384.
La concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/µl par analyse)
Filmer la plaque et centrifuger à 1500g (2730rpm) pendant 2mn

Programme d'amplification PCR[6] : 1 H 15 environ

Detection format : **Multi Color HybProbe ou Monocolor HybProbe TNF-α G-308A** (Selected Filter Combinations : **483-640**)			Reaction volume : **6µl**[8] Reaction volume : **10 µl**[7]	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s)[9] = Pente	Ramp Rate (°C/s)[10] = Pente
DENATURATION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
95	None	00 :10 :00	4.4	4.8
PCR	Cycles : **50**	Analysis Mode :	**Quantification**	**Quantification**
95	None	00 :00 :10	4.4	4.8
57	Single	00 :00 :15	2.2	2.5
72	None	00 :00 :10	4.4	4.8
COURBES DE FUSION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**Melting curves**	**Melting curves**
95	None	00 :01 :00	4.4	4.8
45	None	00 :02 :00	2.2	2.5
80	Continuous			
REFROIDISSEMENT	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
40	None	00 :00 :30	2.2	2.5

Résultats :

TNF-α G-308A	**Génotypage**	**Températures de fusion (Tm)**
Homozygote sauvage	GG	67°C
Homozygote muté	AA	60°C
hétérozygote	GA	60°C+67°C

[1]Amorces Eurogentec.Eurogentec SA Liège science park, rue Bois Saint-Jean 54102 Seraing Belgique

[2]Tib MolBiol, Syntherselabor GmbH, D-12103, Berlin, Germany.
[3]Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 96 puits
[4] Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 384 puits
[5]LightCycler480 Genotyping Master 5X concentré Cat. 04 707 524 001 Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France
[6]Light Cylcler480. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[7]Volume par puits pour plaque 96 puits
[8]Volume par puits pour plaque 384 puits
[9]Pente de courbe de fusion pour plaque 96 puits
[10]Pente de courbe de fusion pour plaque 384 puits

Technique en Light Cycler480 mise au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CHU-Brabois

3.7. Génotypage de *Interleukine 1-α* technique en Light Cycler® LC480

Fiche Technique

***IL1-α C-889T* rs1800587**

Amorces [1]

Sens C-889T 5' TGTTCTACCACCTGAACTAGGC 3'
Antisens C-889T 5' TGGCTAAGTTTGGGAATGGAGAT 3'

Sondes fluorescentes [2]

Probe Flu C-889T 5' GGAAGGCATGGATTTTTACATATGAGCC 3' X
Probe LC Red 640 C-889T 5'TCAATGATGTTGCCTGATTACTATTATT 3' P

Préparation du mix: Les solutions filles (SF) des amorces et de sondes sont preparées à partir des solutions mères (SM).

	Volume (µl/puits de 96)	Volume (µl/puits de 384)	Concentr° finale	(Nbre de puits + 1)[3] (Nbre de puits + 16)[4]
Amorce sens C-889T (4picomol/µl) SM	**1 SF** (SF=5µlde SM+195µlH_2O)	**0,63 SF** (SF=5µl de SM+195µl H_2O)	0,5 µM	
Amorce antisens C-889T (4 picomol/µl) SM	**1 SF** (SF=5µl de SM + 195µlH_2O)	**0,63 SF** (SF=5µl de SM + 195 µl H_2O)	0,5 µM	
Probe Flu C-889T (4 picomol/µl) (SM)	**0,5 SF** (SF=2µl de SM + 48 µl H_2O)	**0,32 SF** (SF=2µl de SM + 48 µl H_2O)	0,2 µM	
Probe Red610 C-889T (8picomol/µl) (SM)	**0,5 SF** (SF=4µl de SM + 46 µl H_2O)	**0,32 SF** (SF=4µl de SM + 46 µl H_2O)	0,4 µM	
Kit Mix Probe Master LC 480 2X[5] (pret à l'emploi)	**5**	**3,13**	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA pour la plaque 96.
Déposer 5 µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 1 µl de DNA pour la plaque 384.
La concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/µl par analyse)
Filmer la plaque et centrifuger à 1500g (2730rpm) pendant 2mn

Programme d'amplification PCR[6] : 2 H environ

Detection format : **Multi Color HybProbe ou Monocolor HybProbe IL1-α C-889T** (Selected Filter Combinations : **483-640**)			Reaction volume : **6µl**[8] Reaction volume : **10 µl**[7]	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s)[9] = Pente	Ramp Rate (°C/s)[10] = Pente
DENATURATION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
95	None	00 :10 :00	4.4	4.8
PCR	Cycles : **40**	Analysis Mode :	**Quantification**	**Quantification**
95	None	00 :00 :10	4.4	4.8
50	Single	00 :00 :10	2.2	2.5
72	None	00 :00 :20	4.4	4.8
COURBES DE FUSION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**Melting curves**	**Melting curves**
95	None	00 :01 :00	4.4	4.8
45	None	00 :02 :00	2.2	2.5
70	Continuous			
REFROIDISSEMENT	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
40	None	00 :00 :30	2.2	2.5

Résultats :

IL1-α C-889T	Génotypage	Températures de fusion (Tm)
Homozygote sauvage	CC	52°C
Homozygote muté	TT	57°C
hétérozygote	CT	52°C+57°C

[1]Amorces Eurogentec.Eurogentec SA Liège science park, rue Bois Saint-Jean 54102 Seraing Belgique

[2]Tib MolBiol, Syntherselabor GmbH, D-12103, Berlin, Germany.
[3]Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 96 puits
[4] Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 384 puits
[5]LightCycler480 Probes Master 2X concentré Cat. 04 707 494 001 Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France
[6]Light Cylcler480. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[7]Volume par puits pour plaque 96 puits
[8]Volume par puits pour plaque 384 puits
[9]Pente de courbe de fusion pour plaque 96 puits
[10]Pente de courbe de fusion pour plaque 384 puits

Technique en Light Cycler480 mise au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CHU-Brabois

3.8. Génotypage de Interleukine 1-β par technique en Light Cycler® LC480

Fiche Technique

IL1-β *C-511T* ***rs16944***

Amorces [1]

Sens C-511T 5' TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC 3'
Antisens C-511T 5' GTT TAG GAA TCT TCC CAC TT 3'

Sondes fluorescentes [2]

Probe Flu C-511T 5' ACA GAG AGC TCC CGA GCA GA 3' X
Probe LC Red 640 C-889T 5' AAC AGC ACC CAA GGT AGA GAC CCA CAC C 3' p

Préparation du mix: Les solutions filles (SF) des amorces et de sondes sont preparées à partir des solutions mères (SM).

	Volume (µl/puits de 96)	Volume (µl/puits de 384)	Concentration finale	(Nbrede puits+ 1)[3] (Nbredepuits+16)[4]
H2O[5]	**3,4**	**2,3**		
MgCl2 25mM[5]	**0,6**	**0,38**	2, 5 mM	
Amorce sens C-511T (4picomol/µl) SM	**1 SF** (SF=4µl de SM+96µlH_2O)	**0,63 SF** (SF=4µldeSM+96µl H_2O)	0,4 µM	
Amorce antisens C-511T (4picomol/µl) SM	**1 SF** (SF=4µl de SM+96µl H_2O	**0,63 SF** (SF=4µl de SM+96µl H_2O)	0,4 µM	
Probe Flu C-511T (4 picomol/µl) (SM)	**0,5 SF** (SF=2µldeSM+48µl H_2O)	**0,32 SF** (SF= 2µl de SM+48µl H_2O)	0,2 µM	
Probe LC Red640 C-511T (8picomol/µl) (SM)	**0,5 SF** (SF= 4µl de SM+46 µl H_2O)	**0,32 SF** (SF= 4µl de SM+46 µlH_2O)	0,4 µM	
Kit LC hybridization probe[5] (Préparer avec 60 µl de la solution **b** dans la solution **a**)	**1**	**0,63**	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA pour la plaque 96.
Déposer 5 µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 1 µl de DNA pour la plaque 384.
La concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/µl par analyse)
Filmer la plaque et centrifuger à 1500g (2730rpm) pendant 2mn

Programme d'amplification PCR[6] : 1H 15 environ

Detection format : Multi Color HybProbe ou Monocolor HybProbe IL1-β C-511T (Selected Filter Combinations : **483-640**)			Reaction volume : **6µl**[8] Reaction volume : **10 µl**[7]	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s)[9] = Pente	Ramp Rate (°C/s)[10] = Pente
DENATURATION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
95	None	00 :10 :00	4.4	4.8
PCR	Cycles : **40**	Analysis Mode :	**Quantification**	**Quantification**
95	None	00 :00 :10	4.4	4.8
52	Single	00 :00 : 05	2.2	2.5
72	None	00 :00 :14	4.4	4.8
COURBES DE FUSION	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**Melting curves**	**Melting curves**
95	None	00 :00 :30	4.4	4.8
42	None	00 :02 :00	2.2	2.5
80	Continuous			
REFROIDISSEMENT	Cycles : **1**	Analysis Mode :	**None**	**None**
40	None	00 :00 :30	2.2	2.5

Résultats :

IL1-β C-511T	**Génotypage**	**Températures de fusion (Tm)**
Homozygote sauvage	CC	66°C
Homozygote muté	TT	59°C
hétérozygote	CT	57°C+ 66°C

[1]Amorces Eurogentec.Eurogentec SA Liège science park, rue Bois Saint-Jean 54102 Seraing Belgique

[2]Tib MolBiol, Syntherselabor GmbH, D-12103, Berlin, Germany.
[3]Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 96 puits
[4] Nombre d'échantillons à considerer pour préparer le mix pour une plaque de 384 puits
[5] LC Fast StartHyb Probes. Rèf. 12 239 272 001. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[6]Light Cylcler480. Roche Diagnostics, BP 59 38242 Meylan Cedex, France.
[7]Volume par puits pour plaque 96 puits
[8]Volume par puits pour plaque 384 puits
[9]Pente de courbe de fusion pour plaque 96 puits
[10]Pente de courbe de fusion pour plaque 384 puits

Technique en Light Cycler480 mise au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CHU-Brabois

4. Analyses statistiques

Les variables nominales ont été rapportées en nombre et pourcentage, et les variables continues en médiane et interquartiles. Un test de chi-carré a été utilisé pour évaluer des différences de variables nominales. Un U-test de Mann-Whitney ou un test de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour les variables continues. Une analyse de régression linéaire multiple a été employée pour évaluer les déterminants indépendants de l'Hcy. L'analyse de régression logistique multivariée par étapes a pris en compte un modèle qui a inclus l'âge, le sexe et toutes les variables qui avaient une valeur de $p < 0,10$. Une valeur p inférieure à 0,05 était considérée comme statistiquement significative. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel de SAS Windows (Institut de SAS, Berkeley, Californie, Etats-Unis) et le logiciel Statview pour Windows (Institut de SAS, Berkeley, Californie).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Allèles *677T* et *1298C* du gène de la methylenetetrahydrofolate réductase et statut en Folates : étude comparative entre Afrique de l'ouest selon les régions, côtières/urbaines et savanne/secteur rural, Mexique, Italie et France (Publications A, B et C)

1.1. Résultats

Nous avons observé les fréquences les plus élevées et plus basses de l'allèle *677T* et du génotype *677TT* au Mexique et dans les pays africains de l'Afrique de l'Ouest, respectivement (Publication C, Tableau 1). L'allèle *T* était également sensiblement plus fréquent en Sicile qu'en France (Pubication C, Tableau 1). Nous avons considéré les sous-groupes de la population française du nord est et nous n'avons trouvé aucune différence significative dans la fréquence de l'allèle *T* (36.1% [28.7, 44.2] contre 36.0% [31.2, 40.8], p=0.6725) et le génotype *677TT* (13.9% [7.8, 23.8] contre 14.3% [9.9, 19.8], p = 0.9262). Les pays de l'Afrique de l'Ouest et le Mexique étaient les deux zones géographiques avec les plus basses fréquences de l'allèle *1298C* et du génotype *1298CC*. La fréquence la plus élevée était observée en France (Publication C, Tableau 1). Les distributions des trois génotypes des polymorphismes *677C>T* et *129A>C de MTHFR* observés dans les 7 secteurs du recrutement n'étaient pas différentes de la distribution théorique selon l'équilibre de Hardy-Weinberg.

La concentration en plasma des t-Hcys, les folates et la vitamine B12 sont présentés dans le Tableau 2 (Publication C). Le Mexique et la Sicile étaient les deux zones géographiques avec le niveau le plus élevé en folates, avec un niveau sensiblement plus bas en Sicile qu'au Mexique. Les niveaux les plus élevés de t-Hcys et les niveaux les plus bas de folates ont été observés dans les pays africains. Le pourcentage le plus élevé de carence en folates a été

enregistré en Afrique, et plus en particulier au Togo, et le plus bas taux au Mexique, en considérant le seuil OMS de 7 nmol/L (Publication C, Tableau 2). Au contraire, un niveau bas de la vitamine B12 (< 100 pmol/L) a été rapporté dans 9.7% [6.3, 13.0], 2.6% [1.0, 5.2], 1.3% [0.2, 4.3] et 0.8% [0.2, 2.1] des sujets du Mexique, la France, l'Italie et l'Afrique, respectivement, avec un pourcentage sensiblement plus élevé au Mexique qu'en France (p=0.0045) et aucune différence significative entre la France, l'Italie et l'Afrique, entre les deux régions de France et entre les trois régions d'Afrique. En Europe, les concentrations en t-Hcys et vitamine B12 étaient respectivement sensiblement inférieures et plus hauts en Italie qu'en France (Publication C, Tableau 2). Dans l'analyse de régression multiple, les folates étaient un prédicteur indépendant significatif de t-Hcys dans les 7zones géographiques, alors que t-Hcys était également associé à la vitamine B12 en Sicile et au Mexique (C, Tableau 3). Le génotype *MTHFR 677TT* a été associé à une augmentation très importante de t-Hcys en Afrique. En revanche, il n'y avait aucun effet additionnel significatif de la double hétérozygosité *677CT/129AC* sur t-Hcys, par rapport au génotype *677CT* / *129AA* (t-Hcys : 10.0 ; 7.9. 12.2 *contre* 10.0 ; 8.1. 14.0, respectivement, p = 0.0952). Nous avons étudié si la fréquence de l'allèle *677T* était associée au statut en folate et autres déterminants du métabolisme de l'homocystéine, dans les 7 zones (Publication C, Tableau 4). Dans l'analyse univariée, nous avons trouvé une corrélation entre la fréquence de l'allèle *T* et, par ordre de signification, la médiane de folates, de t-Hcys et de la concentration en vitamine B12, respectivement. Il existait une association de la fréquence de l'allèle *T* avec les folates des porteurs de 677 CC (Publication C, Figure 2). Nous avons considéré la concentration en folates limité aux homozygotes de 677*CC* afin d'éviter un biais lié à l'effet du génotype *TT* sur la concentration en folates. Une corrélation inverse étroite a été également trouvée entre la fréquence de l'allèle *677T* et le pourcentage des cas ayant un déficit en folates (< 7 nmol/L) (Publication C, Figure 2). Les folates des porteurs *677CC* et, dans une moindre

mesure, t-Hcys étaient les deux prédicteurs significatifs résiduels de la fréquence d'allèle *T*, dans une analyse multivariée par régression qui a inclus également l'âge et la vitamine B12 (C, Tableau 4). Les mêmes résultats ont été obtenus en considérant l'association folates dans des porteurs *677CC* avec la fréquence du génotype *TT* (Publication C, Tableau 4). En revanche, il n'y avait aucune association significative entre la fréquence du génotype *677CT/129AC* et les folates des porteurs *677CC* (p=0.2450).

1.2. Discussion

Notre étude a été réalisée sur un échantillon d'adultes jeunes, ce qui limite l'influence d'une association hypothétique des polymorphismes *677C>T* et *1298A>C* génétiques avec une longévité diminuée. Comme prévu, la fréquence de l'allèle *T* était la plus haute au Mexique, intermédiaire en France et la Sicile et est la plus basse dans les pays d'Afrique occidentale. Nous n'avons pas observé de différence entre les fréquences du génotype *677TT* et l'allèle *677T* entre les populations mexicaines et siciliennes nouveau-nées d'une étude récente (Wilcken et al., 2003) et les jeunes adultes de nos populations du Mexique (p=0.6429) et la Sicile (p=0.5619), respectivement. Elles étaient également semblables entre les nouveaux-nés (Wilcken et al., 2003) et les jeunes adultes de la région est du nord de la France (p=0.9318). En supposant qu'un changement très à long terme d'environnement nutritionnel peut influencer l'allèle *677T* et les fréquences de l'allèle *1298 C* des migrants, il y avait un intérêt à comparer les fréquences d'allèle de jeunes adultes à ceux des nouveaux-nés des populations migrantes correspondantes. Nous avons rapporté une fréquence de l'allèle *677T* au Bénin et au Togo qui était sensiblement inférieure à celle des nouveaux-nés américains noirs d'Atlanta (9.0% [7.1-11.2] contre 13.9 [11.2-17.1], p=0.0269) (Publication C, Tableau 1) (Amouzou et al., 2004 ; Ubbink et al., 1999) et (Amouzou et al., 2004 ; Wilcken et al., 2003). L'allèle *677T*

chez les nouveaux-nés d'origine hispanique à Atlanta (41.1% [32.8-49.8]) était également sensiblement moins fréquent que chez les jeunes adultes de notre population (p=0.0006) et les nouveaux-nés (57.0% [53.9, 60.0], p=0.0008) du Mexique (Tableau 1) (Wilcken et al., 2003). Ces différences de la fréquence d'allèle entre les populations migrantes et autochtones peuvent résulter des variations du recrutement liées à l'âge et du mélange ethnique partiel. Cependant, un effet lié à un changement de la pression liée à l'environnement alimentaire devrait être également prise en compte.

De telles pressions hypothétiques liées à l'environnement alimentaire demeurent spéculatives dans le cas des polymorphismes *MTHFR*. Notre manière pour les évaluer était de comparer les populations qui ont des fréquences contrastées de l'allèle *T* et également des typologies alimentaires distinctes. En utilisant cette approche, nous avons rapporté que la fréquence d'allèle *T* la plus élevée était dans la zone géographiqe qui avait la plus basse influence du génotype *677TT* sur des t-Hcys (Publication C, Figure 1 et Tableau 1). Réciproquement, la plus basse fréquence a été enregistrée en Afrique où l'influence de génotype sur t-Hcys était la plus importante.

Nous avons observé une corrélation étroite de la fréquence de l'allèle *T* avec le niveau de folates ou le pourcentage des individus ayant une concentration de folates inférieure au seuil OMS (Publication C, Figure 2). Les folates plasmatiques des porteurs *677CC* peuvent être considérés comme marqueur biologique d'apport alimentaire à court terme en folates puisque nous avons exclu les cas consommant de manière récurrente des suppléments vitaminiques. Cependant, une limite de notre étude était que nous ne pouvions pas considérer l'effet à long terme du statut en folates sur la fréquence de l'allèle *T*. La concentration la plus élevée en folates et le pourcentage le plus bas de carence ont été enregistrés dans les deux zones, Mexique et Sicile, ayant la fréquence de l'allèle *T* la plus élevée. En fait, la similitude principale entre les deux populations est leur typologie alimentaire. Le régime traditionnel des deux zones est plus

pauvre en protéines animales que le régime occidental. Réciproquement, il est beaucoup plus riche en maïs, haricots, lentilles, fruits frais et légumes (Kushi et al., 1995 ; Turrini et al., 2001 ; Cavantes et al., 1999). Plusieurs évaluations des apports en folates dans les populations de l'Europe ont établi un gradient croissant du sud au nord à comparer au gradient décroissant de la fréquence d'allèle *T*. Par exemple, l'apport en folates a été estimé à 190 µg/jour chez les femmes, en Hollande, 268.2 au ± 91.5 µg/jour chez les femmes, en France et 323 au ± 87 µg/jour chez les femmes d'Italie centrale (Zetterberg, 2004 ; de Bree et al.,2001 ; Kushi et 1995). La forte fréquence de la carence en folates dans les pays ouest-africains peut participer à l'effet phénotypique dramatique de l'allèle *T* sur t-Hcys, exerçant donc une pression environnement-génétique (Amouzou et al., 2004). En effet, pas moins de 26.5% de la population africaine ont eu une concentration en folates au-dessous de la limite de seuil de 7 nmol/L, une proportion nettement plus haute que les 2.1% rapportés au Mexique (Tableau 2). En revanche, pas moins de 9.3% du groupe mexicain ont une vitamine B12 inférieure au seuil de 100 pmol/L, suggérant une forte fréquence de carence, comme noté dans une revue récente sur le statut de la vitamine B en Amérique latine (Publication C, Tableau 2) (Allen, 2004). En outre, la vitamine B12 était un prédicteur de t-Hcys dans les deux populations ayant le statut en folates le plus élevé, Italie et Mexique (Publication C, Tableau 2), comme précédemment rapporté dans les sujets supplémentés en folates (Quinlivan et al. 2002).

Rosenberg et autres ont prouvé que *MTHFR 677T* s'est produite sur un haplotype commun, au moins chez les Africains, Israéliens et Japonais (Rosenberg et al., 2002). Ceci suggère que *MTHFR TT* puisse conférer un avantage de survie dans les populations à statut folique normal (Rosenberg et al., 2002 ; Munoz-Moran et al., 1998). Nos données sont concordantes avec cette hypothèse. Cependant, il peut être difficile d'estimer l'association des mutations de MTHFR avec la viabilité embryo-foetale car la majorité d'avortements spontanés se produisent avant le suivi médical systématique des grossesses. Une étude récente a trouvé un

avantage de survie du génotype *MTHFR 677TT*, avec une fréquence 4-fois plus élevée chez les nouveau-nés, comparés aux foetus avortés (Isolato et al., 2000). En revanche, une plus grande fréquence de l'allèe *677T* combiné et les allèles *1298C* mutés a été rapportée dans une série d'embryons spontanément avortés (Zetterberg et al., 2002). Les taux t-Hcys accrus et ses déterminants génétiques ont été également impliqués dans le risque d'anomalie de fermeture du tube neural (NTD) (van der Put et al., 1995 ; James et al., 1999 ; Nelen et al., 1997 ; Lissak et al., 1999 ; Guéant et al., 2004 ; Kumar e al. 2003) et ces associations semblent être conditionnées par la zone géographique et le statut alimentaire (Guéant et al., 2004 ; Kumar et al., 2003 ; Guéant et al., 2003). Pour NTD et DS, les polymorphismes de *MTHFR* sont prédictifs du risque dans les pays de l'Europe du nord, neutres en Europe occidentale et du sud, où les apports en folates et la fréquence de l'allèle *T* sont beaucoup plus élevés (Zetterberg et al., 2002 ;.van der Put et al. 1995 ; Guéant et al., 2004 ; Kumar et al., 2003 ; Guéant et al., 2003 ; de Franchis et al., 1995 ; Papapetrou et al., 1996 ; Guéant-Rodriguez et al., 2003 ; Stegmanet et al., 1999 ;Whitehead et al., 1995 ; Christensen et al. 1999 ; Shields1999 ; Shields e al., 1999 ; Hobbs et al., 2000 ; Rosenblatt et al., 1999 ; Hassold et al., 2001 ; O'Leary et al., 2002 ; Stuppia et al., 2002 ; Chadefaux-Vekemans et al.,2002 ; Boduroglu et al., 2004).

En conclusion, nous avons montré une association apparente entre la fréquence de l'allèle *677T* et le pourcentage de la carence en folates dans 7 zones géographiques. Cette observation effective est en accord avec l'hypothèse d'une interaction gène-nutrition entre *MTHFR* et statut en folates, au moins dans les zones géographiques étudiées.

La distribution des génotypes du polymorphisme *TCN2* 776 C>G parmi les 7 populations est présentée dans le Tableau 1, Publication D. Trois groupes contrastés pourraient être démontrés, selon la fréquence du génotype homozygote de 776 GG. La fréquence la plus élevée a été rapportée en Chine, ce génotype étant bien plus fréquent que le génotype *776*

CC dans cette population. On a observé une fréquence basse du génotype de GG dans les populations d'Afrique occidentale (Publication D, Tableau 2). En outre, on n'a observé aucune différence entre les sujets du Togo et ceux du Bénin, ni entre ceux de la côte du Togo et ceux de la savane. En revanche, une fréquence plus élevée de deux fois du génotype *TCN2 776 GG* a été rapportée chez les patients du Bénin avec la forme grave de malaria (6.0% [95%CI : 3.7-9.6], Figure 1). Une fréquence intermédiaire a été rapportée dans les populations européennes de France et d'Italie, au Maroc et au Mexique. Étonnamment, la fréquence du génotype *776 GG* chez les Afro-Américains n'était pas sensiblement différente de celle rapportée dans les populations caucasiennes (p =0.8387), et elle était nettement plus élevée que celle observée chez les sujets Afro-Africains (Tableau 1, p = 0.0004). Elle était du même ordre de grandeur que celle rapportée dans un autre groupe d'Afro-Américains des Etats-Unis du Nord-est [Bowen et al., 2004]. Par comparaison, la fréquence du génotype *MTHFR 677 TT* était semblable dans les deux populations africaines d'Afrique et de New York, avec la plus basse des fréquences des sept groupes, comme précédemment rapporté dans d'autres études [Amouzou et al., 2004]. Ceci indique que la différence dans la distribution du génotype *776 GG* n'était pas due au brassage de groupes ethniques et que *MTHFR* et *TCN2* se sont comportés distinctement quant à l'influence de l'environnement sur leur distribution respective.

Les mêmes conclusions ont été obtenues en considérant les fréquences allèliques du polymorphisme *TCN2*, au lieu du génotype *TCN2* 776 GG. L'allèle de 776 G était l'allèle prédominant dans la population chinoise (*p<0.0001*), l'allèle le moins fréquent en Europe occidentale, régions méditerranéennes et au Mexique, et sa fréquence était nettement inférieure chez les sujets Afro-Africains que dans n'importe quel autre groupe ethnique (Tableau 2, p<0.0001). La fréquence de l'allèle G était 2 fois inférieure chez les Afro-Africains, comparés aux Afro-Américains de New York (Tableau 2, p =*0.0012*) et à la

« somme » des Afro-Américains de New York et de l'étude de Bowen et autres (2004) (Tableau 2, p<*0.0001*). La fréquence d'allèle en France n'était pas différente de celle précédemment rapportée en Suède, en Hollande, en Irlande, en Grèce et dans les populations caucasiennes d'Amérique du Nord [Namour et al., 2001 ; Bowen et al.,2004 ; Swanson et al, 2005 ; Lievers et al. 2001 ; Mc Caddon et al., 2001 ; Namour et al., 2001 ; Afmann et al., 2002]. En revanche, elle était sensiblement plus élevée que celle rapportée en Sicile (p = *0.0084*) et au Mexique (p = *0.0161*). La distribution de l'allèle 677 T *MTHFR* parmi les 7 populations était semblable aux données de la littérature [Pepe et al., 1998 ; Amouzou et al., 2004]. En particulier, elle était du même ordre de grandeur chez les Afro-Africains d'Afrique occidentale et les Afro-Américains de New York. En outre, des résultats semblables ont été rapportés dans la population Afro-Africaine d'Atlanta [Wilcken et al., 2003]. Nous avons étudié l'hypothèse d'une influence de gène-gène de *MTHFR* sur la distribution du polymorphisme *TCN2* et vice versa. Nous n'avons pas trouvé de différence de fréquence de *776 G* entre les sujets portant l'allèle *MTFHR 677 T* et ceux portant l'allèle *677 C*, dans n'importe laquelle de ces 7 populations. Il n'y avait aucune évidence de déséquilibre de Hardy-Weinberg en Afrique occidentale, aux Etats-Unis nord-est, le Maroc, en France et en Italie (Chi-place : 0.0002. p = *0.989*, 2.619, p = *0.106*, 0.049, p = *0.825*, 1.869, p = *0.169*, 0.001,p= *0.920* ; 0.350. p = *0.554*, respectivement). En revanche, la fréquence des génotypes *TCN2 776 CG* observés était légèrement plus élevée que prévue dans les échantillons de population provenant de la Chine et du Mexique et plus du double que prévu chez les patients africains présentant la malaria grave (Tableau 3 et Figure 1).

Il n'y avait aucune association entre l'allèle *776G* et la concentration en homocystéine, en folates et en vitamine B12. Le niveau de plasma d'homocystéine était le plus élevé en Afrique, intermédiaire au Maroc, en France et le plus bas en Italie et au Mexique, avec des valeurs respectives de 18.2 ±13.9, 11.4 ±3.2, 10.7 ±3.3, 9.9 ±5.9 et 10.3 ±3.7 µmol/L.

Les folates sériques étaient les plus élevés au Mexique, intermédiaires en Italie, France et Maroc et les plus faibles en Afrique avec des valeurs respectives de 19.5 ±9.4, 13.4 ±6.3, 12.8 ±5.0, 11.3 ±5.1 et 10.8 ±6.8 nmol/L. Par comparaison, le niveau de la vitamine B12 était le plus élevé en Afrique de l'Ouest et au Maroc, intermédiaire au Mexique et en Italie et le plus faible en France, avec des valeurs respectives de 662.4 ±506.4, 590.7 ±428.5, 422.7 ±658.8, 347.5 ±158.7 et 296.8 ±191.4 pmol/L. Le Mexique et la France étaient les deux pays où le percentage le plus élevé de concentration basse en vitamine B12 (< 100 pmol/L) a été rapporté, avec une fréquence respective de 9.3 et 3.7%. Il n'y avait aucun cas de carence en vitamine B12 en Italie et le Maroc et la fréquence de carence en vitamine B12 était aussi basse que 0.8% en Afrique. L'influence phénotypique du polymorphisme *TCN2* 776 C>G sur l'homocystéine était semblable quelle que soit la concentration en vitamine B12.

Publications A, B, C

Publication A

Clin Chem Lab Med 2003; 41(8):1028–1032 © 2003 by Walter de Gruyter · Berlin · New York

Low Frequency of Mutated Methylenetetrahydrofolate Reductase 677C→T and 1298A→C Genetics Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Sub-Saharan Populations

Charles E. Adjalla[1]*, Emile K. Amouzou[1,2]*, Ambaliou Sanni[3], Idrissia Abdelmouttaleb[1], Nicodème W. Chabi[3], Fares Namour[1], Batoma Soussou[4] and Jean-Louis Guéant[1]**

[1] Laboratory of Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, INSERM 00-14, Faculty of Medicine, Vandoeuvre lès Nancy, France
[2] Laboratory of Biochemistry and Nutrition, Lome, Togo
[3] Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Benin
[4] Department of Cardiology, CHU de Lome, Togo

5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase (MTR) are two of the key enzymes in the folate/vitamin B_{12}-dependent remethylation of homocysteine to methionine. The frequencies of *MTHFR* single nucleotide polymorphisms (SNPs), *677C→T, 1298A→C, 1317T→C* and of *MTR, 2756A→G,* have been widely studied in Caucasians, but they have never been reported simultaneously in a large population from Sub-Saharan Africa. Presently, we report the prevalence of these SNPs and their relationship to homocysteine in 240 subjects recruited in West Africa. The frequencies of the mutant genotypes *677TT* (0.8%) and *1298CC* (2%) were lower than that usually observed in Caucasians, while the frequency of the mutant *1317CC* was higher (16%). We formed a systematic association of the mutated *MTHFR 677C→T* SNP with a *1298A/1317T* common haplotype. The MTHFR mutant genotype *677TT* was associated with an intermediate hyperhomocysteinemia (92.4±6.0 μmol/l) higher than that described in Caucasians. The *2756A→G* SNP in the MTR was similarly distributed in Africans compared to Caucasians. In conclusion, the *MTHFR 677TT* or *1298CC* genotypes are much rarer in Africans than in Caucasians. The *677TT* low frequency may be related to the high effect of this mutation on homocysteine metabolism in the environmental conditions of this African region. Clin Chem Lab Med 2003; 41(8):1028–1032

Key words: Homocysteine; Single nucleotide polymorphism; Methylenetetrahydrofolate reductase; Methionine synthase.

Abbreviations: MTHFR, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; MTR, methionine synthase; SNP, single nucleotide polymorphism.

*These authors contributed equally to this work.
**E-mail of the corresponding author:
Jean-Louis.Gueant@medecine.uhp-nancy.fr

Introduction

5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase (MTR) are two of the key enzymes in the folate/vitamin B_{12}-dependent synthesis of methionine, an upstream reaction to both DNA synthesis and DNA methylation. Mutations in the *MTR* or *MTHFR* genes may result in decreased enzyme activity and hyperhomocysteinemia (1, 2). Homocysteine, a branch-point metabolite of methionine metabolism, can be remethylated to methionine by MTR or degraded to cysteine in the trans-sulfuration pathway. The remethylation of homocysteine, which occurs by the transfer of a methyl group from the 5-methyltetrahydrofolate (MeTHF) *via* vitamin B_{12} to homocysteine, is intimately linked to the reduction of the 5,10-methylenetetrahydrofolate by the MTHFR. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs), *677C→T, 1298A→C* including one silent mutation, *1317T→C,* have been identified in the *MTHFR* gene (3). The *677C→T* mutation leads to a thermolabile enzyme that shows a reduced activity and results in a moderate hyperhomocysteinemia when associated with low plasma folate levels in patients with occlusive vascular diseases (4–6). The *1298A→C* SNP is known to result in altered enzyme activity but was not shown to be related to hyperhomocysteinemia in the absence of association with the *MTHFR 677CT* genotype (7). Another SNP, *2756A→G,* has been identified in the vicinity of the binding domain of vitamin B_{12} to the apoenzyme MTR and seems to have no clear effect on homocysteine blood level (8).

The percentage of individuals homozygous for the *677C→T* mutation is between 14% to 18% among the Caucasian population, while this percentage is considerably lower in African-Americans, less than 2% (9, 10). This mutation is associated with a common haplotype that may confer a selective advantage (9). The frequencies of the *MTHFR 1298A→C* and *1317 T→C* and the *MTR 2756A→G* mutations, and their influence on the plasma homocysteine levels, have never been evaluated in a large black population from Africa. The present study was therefore undertaken first to describe the frequency of the three mutations in the *MTHFR* gene and the one in the *MTR* gene in a population from two West African countries, and to look for the respective influence of these genetic factors and of nutritional factors on the plasma homocysteine levels.

Materials and Methods

The study was carried out on a population of 240 healthy subjects including 155 men and 85 women aged 31.7±9.3 years (range 19–55 years). Fasting venous blood was collected into EDTA-containing tubes, and after centrifugation aliquots were stored at −30 °C until analysis. Plasma homocysteine concentrations (protein-bound and free homocysteine) were determined by the fluorescence polarization immunoassay (FPIA) IMx-homocysteine method developed by Abbott (Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA). Buffy coat was prepared from the previously collected blood and genomic DNA was isolated with the Qiagen kit according to the manufacturer recommendations (Qiagen-France, Courtaboeuf cedex, France).

PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) methods were used to determine the genotypes of the four SNPs. Previously described methods were used for the *677C→T* SNP and the two other mutations (*1298A→C, 1317T→C* in the *MTHFR* gene (3, 11, 12)). The *677C→T* creates a *Hinf*I recognition site in a 198 bp amplified DNA fragment, which was used to differentiate the various genotypes: *677CC, 677CT* and *677TT*. The *1298A→C* mutation creates a new recognition site by the *Fnu4H*I on a DNA fragment, the digestion gives different patterns that correspond to the three genotypes *1298AA, 1298AC* and *1298CC*. The *1317T→C* mutation creates a new *Taq*$^{\alpha}$I restriction site that allows differentiation of the three genotypes *1317TT, 1317TC* and *1317CC*. The *2756A→G* mutation in the *MTR* gene creates a recognition site for the restriction enzyme *Hae*III, and this allows the differentiation of the genotypes corresponding to the homozygous mutant *2756GG*, the heterozygous *2756AG* and the homozygous wild-type *2756AA* (8). For all the genotyped SNPs, control DNA was included in each experimental batch to avoid any lack of digestion that could lead to misinterpretation. The protocol of this study has been approved by the local Ethics Committee (from Cotonou, Benin, and Lome, Togo) and all the included subjects gave written consent.

Statistical analysis was performed with StatView 5 for Windows (SAS Institute, Berkeley, California, USA), results were expressed as mean ± SEM. ANOVA followed by Fischer's protected least significance difference (PLSD) test was used for the comparison of the quantitative data, and $p < 0.05$ was considered significant.

Results

The observed frequencies of mutated alleles of the *MTHFR* and *MTR* SNPs are presented in Table 1. All the distributions of these SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium (respective p-values of corrected Chi-square: 0.99, 0.99, 0.40 and 0.47, respectively, for the *MTHFR 677C→T, 1298A→C* and *1317T→C*, and *MTR 2756A→G* SNPs). The genotype frequencies of the homozygotes for the *677C→T, 1298A→C* and *1317T→C* mutations were, respectively, 0.8%, 2% and 16% (Table 2). The percentage of homozygotes *1298CC* for the *MTHFR 1298A→C* was largely below that reported in the Caucasian populations (10–13%); 16% of the study population was homozygous for the *1317T→C* mutation, and the mutated *MTHFR 677C→T* genotype was systematically associated with the wild type of *1317T→C* and *1298A→C* mutations. The mutant genotype frequency observed for the *MTR 2756A→G* mutation, 5.8%, was similar to that commonly reported in the other ethnic groups (4–6%) (13, 14). The 240 subjects had a moderate hyperhomocysteinemia (18.1±1 μmol/l) according to the common classification used for the Caucasian populations (15). Plasma homocysteine concentration was significantly higher in the heterozygous *677CT* and homozygous *677TT* than in the wild-type genotype *677CC* ($p = 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively) (Table 2). No significant differences were found between homocysteine levels for the *MTHFR 1298A→C, 1317T→C* and *MTR 2756A→G* SNPs.

In order to evaluate a possible synergetic effect of the two *MTHFR* SNPs, we combined the different genotypes two-by-two and evaluated the homocysteine concentrations of the *677C→T/1298A→C*-associated genotypes. Three combined genotypes have not been observed in our population: the *677CT/1298CC*, the *677TT/1298AC* and the double homozygous *677TT/1298CC*. The frequency of the observed combined genotypes and their related plasma homocysteine concentrations are shown in Table 3. The plasma homocysteine level was not affected by the *677CC* genotype when combined with any of the three *MTHFR 1298A→C* SNP genotypes. On the contrary, the combined genotypes *677CT/1298AA, 677TT/1298AC* and *677TT/1298AA* had signifi-

Table 1 Mutated allele frequency of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) *677C→T, 1298A→C* and *1317T→C* and of methionine synthase (*MTR*) *2756A→G* in 240 subjects from West Africa.

Allele		Frequency (%)	95% Interval confidence
MTHFR	*677T*	8.7	5.2–12.2
	1298C	16.0	11.5–20.5
	1317C	38.0	32.0–44.0
MTR	*2756G*	27.0	21.6–32.4

Table 2 Plasma homocysteine concentrations according to the *MTHFR (677C→T, 1298A→C, 1317T→C)* and the *MTR 2756A→G* SNPs in a Sub-Saharan population (n = 240).

Genotype	Frequency (%)	Homocysteine (μmol/l)
677CC	83.3	16.3±0.9 [a,b]
677CT	15.9	21.6±2.0 [a,c]
677TT	0.8	92.4±6.0 [b,c]
1298AA	70.0	17.9±1.2
1298AC	28.0	18.3±1.9
1298CC	2.0	16.5±4.0
1317TT	40.0	19.9±2.1
1317TC	44.0	17.3±1.3
1317CC	16.0	15.5±1.2
2756AA	51.7	18.4±1.4
2756AG	42.5	17.5±1.5
2756GG	5.8	18.2±3.7

[a] $p = 0.01$, [b,c] $p<0.001$.

Table 3 Frequency (%) and plasma homocysteine concentrations (mean ± SD) of the *MTHFR* combined genotypes (*677C→T/1298A→C*) in a Sub-Saharan population (n = 240).

677CC			*677CT*	*677TT*	
1298AA	*1298AC*	*1298CC*	*1298AA*	*1298AC*	*1298AA*
(57.8%)	(23.3%)	(2%)	(11.7%)	(4.2%)	(0.8%)
15.7 ± 1[a,b]	17.7 ± 2.1	16.5 ± 3.9[c]	21.6 ± 2.2[a,d]	21.8 ± 4.8	92.4 ± 6[b,c,d]

[a] $p = 0.02$, [b, c, d] $p < 0.0001$. The combined genotype frequencies are in parentheses. The plasma homocysteine was expressed in μmol/l.

cantly increased plasma homocysteine levels when compared to that of the wild-type *677CC*-combined genotypes (*677CC/1298AA, 677CC/1298AC, 677CC/1298CC*) (Table 3).

Discussion

To our knowledge, this is the first study that determines the frequency of the three common mutations identified in the *MTHFR* gene and the one described in the *MTR* gene and evaluates their influence on the plasma homocysteine level in a large population from Sub-Saharan Africa. Several studies have reported that the *677C→T* mutation has significantly heterogeneous distribution among different ethnic groups (10, 16, 17). Two other studies on Mexican populations have reported a high frequency of the mutant homozygotes *677TT* (18, 19). In contrast, in a comparison of the frequencies of the *MTHFR 677C→T* SNP between white and black South Africans, Loktionov *et al.* found no homozygous individual *677TT* in the studied black population (20). The *1298A→C* SNP was less common in our study population than in the other reported studies (3, 13, 21). With regard to the double heterozygosity for the *MTHFR 677C→T* and *1298A→C* SNPs, the frequency reported for the Caucasians is 20% (13, 21). In our study, this frequency was relatively low (4.2%). With respect to the *1317T→C* silent mutation, the genotype frequency of the homozygotes *1317CC* in our study population was 16%, with an allele frequency of 38%. In contrast, in a recent study on 450 Dutch individuals, van der Put and Blom have reported a 0.3% allele frequency for the *1317T→C* mutation and found no homozygote for this silent mutation (22). The high frequency of the *MTHFR* silent mutation *1317T→C* in the black population therefore presents a complete inverse picture to what was observed in Caucasians. It has been recently shown that the *677 C→T* mutation is associated with a *G-T-A-C* haplotype in populations from Israel, Japan and Ghana and that it may confer a survival advantage in populations with adequate folate intake (9). In our study, we observed a systematic association of the mutated *MTHFR 677C→T* SNP with another *1298A/1317T* common haplotype. This observation is an additional argument suggesting that the *MTHFR 677C→T* mutation had occurred once on a common haplotype (9). We observed an MTHFR-dependent moderate hyperhomocysteinemia in our population, although the mean age of the study population was below 60 years, the age above which an increase can be observed in the plasma homocysteine concentration (23, 24). A gradual significant increase was obvious when the plasma homocysteine level of the *677CC* was compared to that of the heterozygous *677CT* and of the homozygous mutant *677TT*. It is, however, noteworthy that only two individuals in the study population were mutant homozygous *677TT* for the *677C→T* SNP, and their mean plasma homocysteine concentration was largely above 30 μmol/l, which according to the commonly used classification is an intermediate hyperhomocysteinemia (15). Such a dramatic effect of the homozygous *677TT* genotype on plasma homocysteine concentration may be explained by a synergistic influence of environmental factors. Folates may be one of them. Finally, it may be hypothesized that the low frequency of the homozygous *677TT* genotype observed in Africa is related to a dramatic influence on homocysteine concentration potentiated by environmental and nutritional factors, in contrast to what is observed in Europe and North America (9).

The *1298A→C* SNP seems to be less frequent in black populations than in Caucasians (Table 2). The double heterozygosity *677CT/1298AC* of the *MTHFR* gene was associated with a significantly increased plasma homocysteine concentration in Caucasians (7), but not in our populations. Therefore, unlike the previously reported results, the increased plasma homocysteine concentration observed in the combined genotypes of the *677C→T* and *1298A→C* might only be due to the *677C→T* mutation.

In a study carried out on a group of black and white young volunteers who had a similar lifestyle in a South African population, Ubbink *et al.* found no difference in the fasting plasma homocysteine levels between the two populations, except an increase in the plasma homocysteine concentration in the white group after methionine loading (25). These authors concluded that blacks might metabolize homocysteine more effectively than Caucasians. The high frequency of *MTHFR 677C→T* wild-type genotype in Africa may explain the lower homocysteine concentration in blacks, after methionine loading, considering the more favorable catalytic rate of the wild-type phenotype of the enzyme (4, 5).

The frequency of the individuals homozygous for the

2756A→G SNP in the *MTR* gene was similar to that reported in Caucasian populations. As already reported in previous studies, we found no relationship between homocysteine level and the SNP *2756 A→G* in the *MTR* gene (13, 14).

In conclusion, homozygosity for the *677C→T* mutation in the *MTHFR* gene is very rare in two apparently healthy Sub-Saharan populations from Benin and Togo, in contrast to what has been observed in Caucasians. This low frequency may be related to a higher effect of this mutation on homocysteine metabolism in these populations, compared to Caucasians, which may be due to its association with environmental factors.

Acknowledgements

The "Centre Beninois de la Recherche Scientifique et Technique" (CBRST) and its Director Prof. F. Toukourou are thanked for financial support of the work performed in Benin.

E. K. Amouzou and N. W. Chabi received fellowships from the French Mission of Cooperation in Togo and in Benin.

References

1. Mudd SH, Levy HL, Skovky D. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle DL, editors. The metabolic and molecular basis of inherited disease, 7th ed, vol. 2. New York: McGraw-Hill, 1995:1279–327.
2. Rosenblatt DS. Inherited disorder of folate transport and metabolism In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle DL, editors. The metabolic and molecular basis of inherited disease, 7th ed, vol. 2. New York: McGraw-Hill, 1995:3111–28.
3. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic SNP in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Mol Genet Metab 1998; 64:169–72.
4. Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, *et al.* Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a risk factor for cardiovascular disease. Am J Hum Genet 1996; 58:35–41.
5. Legnani C, Palareti G, Grauso F, Sassi S, Grossi G, Piazzi S, *et al.* Hyperhomocysteinemia and a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation (Ala223Val MTHFR) in patients with inherited thrombophilic coagulation defects. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17:2924–9.
6. Arruda VR, von Zuben PM, Chiaparini LC, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. The mutation ala677-val in the methylenetetrahydrfolate reductase gene as a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. Thromb Haemost 1997; 77:818–21.
7. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, *et al.* A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube-defects? Am J Hum Genet 1998; 62:1044–51.
8. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, *et al.* Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cbl*G* complementation group of folate/cobalamin disorders. Hum Mol Genet 1996; 5:1867–71.
9. Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, *et al.* The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T SNP is associated with a common haplotype in Whites, Japanese, and Africans. Am J Hum Genet 2002;70:758–62.
10. Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ. Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies between whites and blacks. Am J Hum Genet 1997; 60:229–30.
11. Anwar W, Guéant JL, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Gerard P, Lemoel G, *et al.* Hyperhomocysteinemia is related to residual glomerular filtration and folate, but not to methylenetetrahydrofolate-reductase and methionine synthase SNPs, in supplemented end-stage renal disease patients undergoing hemodialysis. Clin Chem Lab Med 2001; 39:747–52.
12. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995; 10:111–3.
13. van der Put NM, van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK, *et al.* Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural tube defects and vascular disease. Q J Med 1998; 90:511–7.
14. Wang XL, Cai H, Cranney G, Wilcken DE. The frequency of a common mutation of the methionine synthase gene in the Australian population and its relation to smoking and coronary artery disease. J Cardiovasc Risk 1998; 5:289–95.
15. Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, Nygard O, Schneede J, Vollset SE, *et al.* Determinants and vitamins responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (>40 mmol/l). The Hordaland Homocysteine study. J Clin Invest 1996; 9:2174–83.
16. Franco RF, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. Thromb Haemost 1998; 79:119–21.
17. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. Am J Hum Genet 1998; 62:1258–60.
18. Lopez MA, Zuniga J, Granados J, Mutchinick OM. Methylenetetrahydrofolates reductase C677T and A1298C gene mutations in an inbred group of Mazateco Indians: an ethnic genetic marker for some amerindian populations. Am J Hum Genet 1999; 65S:1156.
19. Mutchinick OM, Lopez MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. Mol Genet Metab 1999; 68:461–7.
20. Loktionov A, Vorster H, O'Neill IK, Nell T, Bingham SA, Runswick SA, *et al.* Apolipoprotein E and methylenetetrahydrofolate reductase genetic SNPs in relation to other risk factors for cardiovascular disease in UK Caucasians and Black South Africans. Atherosclerosis 1999; 145:125–35.
21. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic SNPs: an examination of C677T and A1298C mutations. Am J Hum Genet 2000; 67:986–90.
22. van der Put NM, Blom HJ. Reply to Donnelly. Am J Hum Genet 2000; 66:744–5.
23. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate levels in normal subjects. Clin Chem 1994; 40:873–81.

24. Brattström L, Lindgren A, Israelsson B, Andersson A, Hultberg B. Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. J Int Med 1994; 236:631–4.
25. Ubbink JB, Vermaak WJ, Delport R, van der Merwe A, Becker PJ, Potgieter H. Effective homocysteine metabolism may protect African blacks against coronary heart disease. Am J Clin Nutr 1995; 62:802–3.

Received 27 February 2003, revised 12 May 2003, accepted 12 May 2003

Corresponding author: Professor J. L. Guéant, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, INSERM 00-14, Faculty of Medicine, B.P. 184, 54505 Vandoeuvre lès Nancy cedex, France
Phone: +33 3 83 68 32 92, Fax: +33 3 83 68 32 79,
E-mail: Jean-Louis.Gueant@medecine.uhp-nancy.fr

Publication B

High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C→T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa[1–3]

Emile K Amouzou, Nicodème W Chabi, Charles E Adjalla, Rosa M Rodriguez-Guéant, François Feillet, Christian Villaume, Ambaliou Sanni, and Jean-Louis Guéant

ABSTRACT

Background: Moderate hyperhomocysteinemia is a risk for neural tube defect and neurodegenerative and vascular diseases and has nutritional, metabolic, and genetic determinants. Its prevalence in sub-Saharan Africa remains unknown.

Objective: Our goal was to evaluate the prevalence of hyperhomocysteinemia and the influence of nutritional, metabolic, and genetic determinants in savanna and coastal regions of Togo and Benin.

Design: Volunteers were recruited from coastal (C groups; $n = 208$) and savanna (S group; $n = 68$) regions. Vitamin B-12, folate, total homocysteine (tHcy), cystatin C (a marker of glomerular filtration), and inflammatory and nutritional protein markers were measured in plasma, and the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 677C→T and 1298A→C polymorphisms and the methionine synthase 2756A→G polymorphism were examined in genomic DNA.

Results: Moderate hyperhomocysteinemia (tHcy > 15 μmol/L) was recorded in 62.3% and 29.4% of the subjects from the coast and savanna, respectively ($P < 0.0001$). A histogram distribution of tHcy in the coastal groups showed a distinct group, C2 (15% of the total group), with tHcy > 28 μmol/L. Folate < 6.75 nmol/L (lower quartile) and *MTHFR CT/TT* genotype were the 2 main risk factors for moderate hyperhomocysteinemia in the whole population [odds ratios: 5.3 (95% CI: 2.5, 11.2; $P < 0.0001$) and 4.9 (1.6, 14.8; $P = 0.0048$), respectively] and in the C2 group [odds ratios: 15.9 (4.5, 56.8; $P < 0.0001$) and 9.0 (2.3, −35.2; $P = 0.0017$), respectively]. Cystatin C was another potent risk factor in the C2 group.

Conclusion: A high prevalence of hyperhomocysteinemia in coastal West Africa, related to folate concentrations and the *MTHFR* 677 *T* allele, suggests the need to evaluate the influence of hyperhomocysteinemia on disease in this area. *Am J Clin Nutr* 2004;79:619–24.

KEY WORDS Homocysteine, folate, vitamin B-12, methylenetetrahydrofolate reductase, cystatin C

INTRODUCTION

Homocysteine is a circulating sulfur amino acid, concentrations of which depend on folate and vitamin B-12 nutritional status; metabolic disorders, such as chronic renal disease; and genetic factors. The prevalence of moderate hyperhomocysteinemia in North America and Europe has been widely evaluated as a risk factor for coronary artery disease, neurodegenerative diseases, and spina bifida (1). Differences in the prevalence of hyperhomocysteinemia have been reported in various ethnic groups. Asian Americans have significantly lower total homocysteine (tHcy) concentrations than do whites (2), whereas Hispanic Americans have intermediate values. Another study reported higher concentrations of tHcy in African Americans than in European Americans, which may be related to the prevalence of nutrient deficiencies (3). In South Africa, plasma homocysteine concentrations were reported to be significantly lower in traditionally living adult black men than in whites (4). Blacks metabolized homocysteine more efficiently than did whites, even after vitamin supplementation, which suggests the influence of genetic factors. The prevalence of moderate hyperhomocysteinemia in sub-Saharan Africa is unknown.

The known genetic determinants of tHcy are polymorphisms of the genes encoding enzymes involved in one-carbon metabolism. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase (MTR) are 2 key enzymes in the folate- and vitamin B-12–dependent transmethylation of homocysteine into methionine (5, 6). Three single-nucleotide polymorphisms, 677C→T, 1298A→C, and 1317T→C (a silent mutation), have been identified in the *MTHFR* gene (7). The 677C→T mutation leads to moderate hyperhomocysteinemia when associated with low plasma folate (8–10). The 1298A→C mutation was shown to be related to hyperhomocysteinemia in association with the *MTHFR* 677C→T genotype (11). Another polymorphism, 2756A→G, has been identified in the *MTR* gene, but its association with tHcy was not established (12). The percentage of individuals homozygous for the 677C→T mutation ranges between 14% and 18% among whites but is considerably lower in African Americans (on the order of 0–2%) (13).

[1] From the Laboratory of Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, EMI INSERM 00-14, Vandoeuvre-les-Nancy, France (EKA, CEA, RMR-G, FF, CV, and J-LG); the Laboratory of Biochemistry and Nutrition, Lomé, Togo (EKA); and the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Benin (NWC and AS).

[2] The work performed in Benin was supported by the Centre Beninois de la Recherche Scientifique et Technique. EKA and NWC received fellowships from the French Mission of Cooperation in Togo and in Benin.

[3] Address reprint requests to J-L Guéant, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, INSERM EMI 0014, Medical Faculty, University of Nancy I, 54505 Vandoeuvre les Nancy cedex, France. E-mail: jean-louis.gueant@medecine.uhp-nancy.fr.

Received February 6, 2003.
Accepted for publication September 10, 2003.

The frequencies of the *MTHFR* 1298A→C and *MTR* 2756A→G mutations and their influence on plasma homocysteine concentrations have never been evaluated in a black population from Africa concurrently with nutritional determinants of hyperhomocysteinemia. In the present study, we evaluated the influence of nutritional (folate and vitamin B-12), metabolic, and genetic (*MTHFR* and *MTR* polymorphisms) determinants of homocysteine concentrations in Benin and Togo, 2 neighboring tropical countries of West Africa in which cardiovascular diseases are relatively less frequent than in Western countries. Special attention was paid when comparing the populations from coastal and savanna regions because of differences in diet between these 2 regions.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

A total of 276 volunteers were recruited after they provided informed consent. The volunteers from the coast were recruited in Togo (127 subjects) and in Benin (81 subjects). The volunteers from the savanna were recruited only in Togo (68 subjects). The local ethical committees approved the study protocol.

Materials and methods

Venous blood from fasting subjects was collected in EDTA-containing tubes. The samples were immediately centrifuged at 1500 × *g* for 15 min at −4 °C and were stored at −30 °C until analyzed. Plasma concentrations of vitamin B-12 and folate were assayed with an immunoassay kit on an ACS 180 automated chemiluminescent system (Chiron Diagnostics Corporation, East Walpole, MA). Plasma homocysteine concentrations were measured by use of the Abbott fluorescence polarization immunoassay (Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL). Nutritional and inflammatory protein markers were determined by immunonephelometry with an Array Protein System analyzer (Beckman, Berkeley, CA). Serum cystatin C concentrations were measured by particle-enhanced immunonephelometry (Behring, Marburg, Germany). Serum creatinine (Jaffe method), uric acid, and urea concentrations were measured on a Hitachi model 917 multichannel analyzer (Hitachi, Tokyo).

Genomic DNA was isolated from the buffy coat layer of blood by using Qiagen kits according to the manufacturer's recommendations (Qiagen-France, Courtaboeuf, France). Polymerase chain reaction–based restriction fragment length polymorphism methods were used to determine genotypes. Previously described methods were used for the 677C→T and 1298A→C mutations of the *MTHFR* gene (7, 14, 15). The 677C→T mutation creates a *Hinf*I recognition site and the 1298A→C mutation creates a *Fnu*4HI recognition site. The 2756A→G mutation in *MTR* creates a *Hae*III recognition site. For all genotype determinations, each experimental batch of DNA was analyzed in parallel with control DNA to avoid misinterpretation from any lack of digestion of the experimental DNA (15).

Statistical analyses

Categorical variables are reported as *n*'s and percentages and continuous variables as medians with 10th and 90th percentiles. For categorical variables, a continuity-corrected chi-square test was used to assess differences between the groups. For continuous variables, Student's *t* test for unpaired data and Bonferroni's adjustment were used for the comparisons. In the case of skewed distributions of data, logarithmic transformations were carried out to normalize the distributions. Multiple regression analysis was used to estimate the relation among tHcy, folate, vitamin B-12, and the nutritional and metabolic markers. Significance and odds ratios (ORs) of independent categorical and continuous determinants of tHcy were determined by multivariate logistic regression analysis. *P* values < 0.05 were considered to indicate statistical significance. The data were analyzed by using STATVIEW 5 software for WINDOWS (SAS Institute Inc, Berkley, CA).

TABLE 1
Clinical and biological data for the 276 subjects studied[1]

					p[2]			
	Group S	Group C	Group C1	Group C2	S vs C	S vs C1	S vs C2	C1 vs C2
No. of subjects [*n* (%)]	68 (24.6)	208 (75.4)	166 (60.2)	42 (15.2)				
Sex ratio (F/M)	0.70	0.59	0.76	0.24	0.5412	0.7570	0.0120	0.0025
Age (y)	29.5 (20–54)[3]	26 (22–48)	25 (20–50)	27 (20–50)	0.0225	0.0218	0.124	0.4858
BMI (kg/m^2)	23.5 (17.5–34.9)	22.2 (19.3–26.3)	22.2 (17–31)	21.7 (17–31)	0.0087	0.0142	0.0612	0.8250
Homocysteine (μmol/L)	11.6 (7.1–21.8)	14.1 (8.4–40.6)	12.6 (8.1–20.5)	40.3 (30.9–70.2)	0.0036	0.5550	0.0001	0.0001
Folate (nmol/L)	8.4 (4.09–18.2)	9.2 (5.05–17.65)	10.0 (5.5–19.1)	6.1 (3.9–11.8)	0.3317	0.0646	0.0363	0.0001
Vitamin B-12 (pmol/L)	551.6 (282.1–907.1)	451.15 (213.7–916.3)	524.6 (237–1128.5)	354.4 (171.1–1064.6)	0.2049	0.8574	0.0030	0.0018
Albumin (mmol/L)	0.58 (0.44–0.69)	0.62 (0.58–0.77)	0.62 (0.44–0.77)	0.65 (0.42–0.75)	0.0001	0.0001	0.0001	0.1358
Prealbumin (μmol/L)	3.8 (1.2–5.4)	4.5 (1.2–41.8)	4.5 (1.2–41.8)	4.5 (1.2–41.8)	0.0001	0.0001	0.0003	0.4977
Retinol-binding protein (μmol/L)	1.32 (0.80–2.12)	1.41 (0.81–2.21)	1.37 (0.78–2.21)	1.59 (1.03–3.59)	0.1601	0.3797	0.0321	0.1246
C-reactive protein (nmol/L)	0.3 (0.3–0.9)	0.3 (0.3–2.7)	0.3 (0.3–2.7)	0.3 (0.3–2.7)	0.7534	0.6559	0.8591	0.6433
Creatinine (μmol/L)	0.07 (0.06–0.12)	0.08 (0.06–0.11)	0.08 (0.04–0.3)	0.08 (0.07–0.54)	0.0017	0.0126	0.0005	0.1432
Cystatine C (nmol/L)	0.06 (0.03–0.08)	0.06 (0.02–0.13)	0.06 (0.02–0.12)	0.07 (0.04–0.13)	0.3874	0.6757	0.1010	0.2096

[1] S, savanna; C, coast; C1, subjects from the coast with homocysteine concentrations < 28 μmol/L; C2, subjects from the coast with homocysteine concentrations > 28 μmol/L.

[2] Student's *t* test with Bonferroni adjustment of log-transformed data.

[3] Median; 10th–90th percentile in parentheses (all such values).

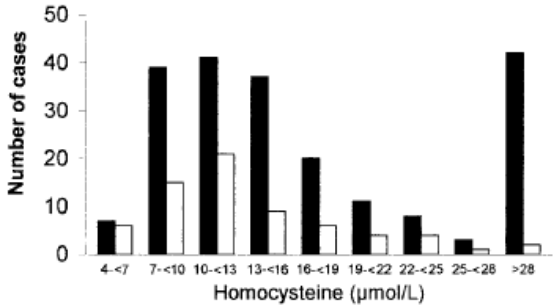


FIGURE 1. Comparative distribution of plasma homocysteine in volunteers from the coast (■; $n = 208$) and savanna (□; $n = 68$) of Western Africa. A distinct group with homocysteine concentrations > 28 μmol/L was identified among the volunteers from the coast.

RESULTS

The main characteristics of the population (age, sex, and biological data) are presented in **Table 1**. The median tHcy concentration in the whole population was 13.5 μmol/L. No significant differences in plasma tHcy were found in relation to sex or age. Because the distributions of age and sex and the biological data for subjects from the Benin and Togo coastal regions did not differ significantly, we considered these subjects as a single population (group C). Plasma tHcy exceeded the threshold value for moderate hyperhomocysteinemia of 15 μmol/L (1) in 56.2% of the whole population and in a much higher proportion of subjects from the coast (group C) than from the savanna (group S): 62.3% and 29.4%, respectively ($P < 0.0001$). Median tHcy concentrations were also significantly higher in the C group than in the S group: 14.1 and 11.6 μmol/L, respectively ($P = 0.0036$). The same was observed for albumin and creatinine, whereas BMI was higher in the S group than in the C group. No significant differences in vitamin B-12 or folate were observed between the C and S groups.

The histogram distribution of tHcy in the S group ($n = 68$) was continuous and nearly symmetrical for 66 subjects, with a upper tHcy concentration of 28 μmol/L. The data points for 2 subjects were outliers, with respective values of 32 and 69 μmol/L. By comparison, the tHcy distribution of the coastal population showed 2 distinct groups: C1 ($n = 166$; 85% of the subjects in the C group), which had tHcy concentrations less than the 28-μmol/L upper limit observed in the S group and a continuous distribution similar to that of the S group, and C2 ($n = 42$; 15% of the subjects in the C group), which had a skewed distribution of tHcy concentrations exceeding the threshold value (**Figure 1**). All of the subjects from group C2 were recruited in 2 cities, Cotonou and Lomé.

No significant difference in either BMI or protein nutritional markers was found between the C1 and C2 groups (Table 1). In contrast, the sex ratio, folate, and vitamin B-12 were lower in group C2 than in group C1(Table 1). This suggests that the hyperhomocysteinemia in group C2 was due, at least in part, to a deficient status of these vitamins. Blood folate concentrations were below the lower quartile (6.75 nmol/L) in as many as 51% of the subjects from group C2 and in 20.5% and 33.3% of the subjects from groups C1 and S, respectively. In fact, 52% of the subjects from group C2 had blood folate concentrations less than the 7.0-nmol/L threshold value defined for folate deficiency, whereas only 5% had a vitamin B-12 concentration less than the 150-pmol/L threshold value (1).

Blood concentrations of cystatin C, folate, and albumin were the 3 significant independent determinants of tHcy in multiple regression analysis of the whole population (**Table 2**). RBP, cystatin C, and uric acid were the 3 determinants of tHcy in group C1 (Table 2). Folate was a weaker determinant of tHcy in group C2 than in group S (Table 2), but in logistic regression analysis, a concentration below the lower quartile (6.75 nmol/L) generated a potent risk of tHcy > 28 μmol/L (**Table 3**).

We investigated the genetic polymorphism of *MTHFR* and *MTR* as determinants of homocysteine concentrations in the coastal and savanna regions. The distributions of all of the polymorphisms were in Hardy Weinberg equilibrium. The genotypes and allele frequencies of the *MTHFR* 677C→T and 1298A→C and the *MTR* 2756A→G mutations are presented in **Tables 4** and **5**, respectively. No significant difference in frequency was observed for the 2 *MTHFR* polymorphisms and the *MTR* polymorphism between the coast (C1 + C2 groups) and savanna regions. However, we found a clear difference in the *MTHFR* 677→T polymorphism distribution when we compared group C2 with groups C1 and S (Tables 4 and 5). In fact, the *MTHFR* 677 *TT* mutant homozygous genotype was observed only in group C2, and the heterozygous *CT* genotype was also significantly more frequent in group C2, suggesting a role of this polymorphism as a determinant of hyperhomocysteinemia. In logistic regression analysis, the *MTHFR* 677 *T* mutated allele was a potent risk factor for mild hyperhomocysteinemia in the whole population and in group C2 (Table 3). The other determinants that increased the risk of having a tHcy concentration > 28 μmol/L were, by decreasing order of odds ratios, folate less than the lower quartile, cystatin C, and albumin (Table 3). The concentration of tHcy of

TABLE 2
Stepwise multiple regression analysis of independent determinants (continuous variables) of total homocysteine (tHcy)[1]

Group	Residual determinants	Coefficient	*P*
Whole population	Folate	−0.353	0.0005
	Albumin	0.689	0.0008
	Cystatin C	10.424	< 0.0001
Coast, group C1 (tHcy < 28 μmol/L)	Retinol-binding protein	−0.084	0.0054
	Cystatin C	4.930	0.0022
	Uric acid	0.098	0.0011
Coast, group C2 (tHcy > 28 μmol/L)	Folate	−1.463	0.0432
Savanna	Folate	−0.549	0.0028

[1] Nonsignificant determinants excluded were age, BMI, vitamin B-12, C-reactive protein, albumin, prealbumin, retinol-binding protein, cystatin C, creatinine, and uric acid.

TABLE 3
Evaluation by logistic regression analysis of the risk (odds ratio) of mild hyperhomocysteinemia related to genetic and nutritional determinants[1]

Dependent determinant	Residual determinants	Odds ratio (95% CI)	*P*
Homocysteine > 13.5 μmol/L (median, whole population)	Folate < 6.75 nmol/L (lower quartile)	5.3 (2.5, 11.2)	< 0.0001
	MTHFR 677 *T* allele	4.9 (1.6, 14.8)	0.0048
	Creatinine	1.3 (1.0, 1.6)	0.0330
Homocysteine > 28 μmol/L (group C2)	Folate < 6.75 nmol/L (lower quartile)	15.9 (4.5, 56.8)	< 0.0001
	MTHFR 677 *T* allele	9.0 (2.3, 35.2)	0.0017
	Cystatin C	7.7 (2.0, 29.9)	0.0030
	Albumin	1.2 (1.00, 1.3)	0.0451

[1] Nonsignificant determinants excluded were age, BMI, vitamin B-12, C-reactive protein, prealbumin, retinol-binding protein, and uric acid. MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase. Group C2, subjects from the coast with homocysteine concentrations > 28 μmol/L.

the whole population was significantly lower in the subjects with the *MTHFR* 677 *CC* genotype than in those with either the *CT* or *TT* genotypes, with respective values (median and 10th–90th percentiles) of 12.6 (8.0–30.5), 19.1 (9.9–46.2), and 86.4 (59.1–95.5) μmol/L ($P = 0.0100$ and $P = 0.0011$, respectively), whereas no significant difference was observed for folate. In contrast, tHcy concentrations of subjects with the 677 *CT* and wild-type *MTHFR* genotypes were not significantly different in group C2 [39.1 (31.9–66.4) and 39.0 (30.8–53.9) μmol/L, respectively]. The other polymorphisms from *MTHFR* and *MTR* had no significant influence on tHcy.

DISCUSSION

In the present study, we observed a high prevalence of age-independent moderate hyperhomocysteinemia in the population from the coast of Togo and Benin. The 13.5-μmol/L median concentration of tHcy is 3.5 and 1.5 μmol/L higher than average tHcy values recorded in northern and southern Europe, respectively (16). There is a north-to-south increase in the frequency of the *MTHFR 677 T* allele in Europe, which may explain in part the tHcy gradient (16, 17). However, the *MTHFR* polymorphism corresponds to only 12.3% of the total sample variance in tHcy (16). Another determinant of tHcy, folate, may limit this gradient, in regard to the apparently higher folate content of the food of Mediterrannean populations (18). In the present study, folate was the main determinant of mild hyperhomocysteinemia (Table 3).

Blood folate concentrations were lower in group C2 than in groups C1 and S, and this low folate concentration (lower quartile) generated a 15.9-fold increased risk of having homocysteine concentrations > 28 μmol/L in this group. The subjects of group C2 were recruited in Lomé and Cotonou, in contrast with the rural origin of the group from the savanna. Our data show, therefore, that dietary folate intake was deficient mostly in a defined population from these 2 towns, as illustrated by the distinct plasma tHcy distributions in groups C1 and C2 (Figure 1). This difference was not explained by differences in traditional diet between the coast and the savanna, even though the traditional diets of the 2 regions differ in sources of micronutrients (19). Cereals (corn, millet, and sorghum) are predominant in the savanna, whereas starchy foods (cassava, yams, and sweet potatoes) are predominant on the coast. Daily folate intake is nearly identical in the coastal and savanna regions, with respective estimated values of 280.5 and 312.6 μg/d (19).

The hyperhomocysteinemia observed in as much as 15% of the population of the coast could therefore correspond to an inadequate intake of folate related to a high frequency of poverty in the 2 towns. Animal sources of micronutrients, in contrast with vegetal sources, are predominant on the coast, explaining why the dietary intake of vitamin B-12 is higher on the coast than in the savanna, with respective estimated values of 5.7 and 3.5 μg/d (19). This difference in the average dietary intake of vitamin B-12 could account for the higher concentrations of this vitamin in the subjects from the coast (Table 1). Blood concentrations of vitamin B-12 were not a determinant of hyperhomocysteinemia and were below the threshold value indicating vitamin B-12 deficiency in only 12 subjects in the whole population. In addition, 10 of these 12 subjects belonged to group C1 and only 2 to belonged to group C2, which confirms that vitamin B-12 deficiency was not a frequent cause of hyperhomocysteinemia in the coastal population.

TABLE 4
Frequency of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 677C→T and 1298A→C and methionine synthase (*MTR*) 2756A→G polymorphisms in the populations from the coast and the savanna[1]

	MTHFR 677			*MTHFR* 1298			*MTR* 2756		
Geographic origin	*CC*	*CT*	*TT*	*AA*	*AC*	*CC*	*AA*	*AG*	*GG*
		n (%)			*n (%)*			*n (%)*	
Savanna, group S ($n = 68$)	60 (88.2)	8 (11.7)	0	50 (73.5)	15 (22.1)	3 (4.4)	41 (60.2)	21 (30.8)	6 (8.8)
Coast, group C1 ($n = 166$)	144 (86.7)	22 (13.2)	0	115 (69.4)	48 (28.8)	3 (1.7)	78 (46.9)	79 (47.6)[2]	9 (2.4)
Coast, group C2 ($n = 42$)	23 (54.7)	16 (38.2)[3,4]	3 (7.1)	29 (69.1)	12 (28.5)	1 (2.4)	23 (54.7)	18 (42.8)	1 (2.3)

[1] Group C1, subjects with homocysteine concentrations < 28 μmol/L; group C2, subjects with homocysteine concentrations > 28 μmol/L.
[2] Significantly different from group S, chi-square = 12.2, $P = 0.0005$ (Bonferroni corrected).
[3] Significantly different from group C1, chi-square = 16.1, $P < 0.0001$ (Bonferroni corrected).
[4] Significantly different from group S, chi-square = 4.8, $P = 0.0277$ (Bonferroni corrected).

TABLE 5
Mutated allele frequency of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) 677C→T and methionine synthase (*MTR*) 2758A→G polymorphisms in the populations from the coast and the savanna[1]

Geographic origin	*MTHFR* 677 *T* allele	*MTHFR* 1298 *C* allele	*MTR* 2756 *G* allele
	%	%	%
Savanna, group S (n = 68)	5.9 (0.3, 11.4)	15.4 (6.5, 23.9)	24.3 (13.8, 34.1)
Coast, group C1 (n = 166)	6.6 (3.1, 10.8)	16.3 (10.5, 21.6)	29.2 (19.5, 32.8)
Coast, group C2 (n = 42)	26.2[2,3] (13.0, 39.6)	16.7 (5.4, 27.9)	23.8 (13.7, 40.5)

[1] All values are frequencies; 95% CI in parentheses. Group C1, subjects with homocysteine concentrations < 28 μmol/L; group C2, subjects with homocysteine concentrations > 28 μmol/L.
[2] Significantly different from group S, chi-square = 18.2, $P < 0.0001$ (Bonferroni corrected).
[3] Significantly different from group C1, chi-square = 16.1, $P < 0.0001$ (Bonferroni corrected).

A mutated *MTHFR* genotype was the single genetic determinant of hyperhomocysteinemia. The influence of this polymorphism on tHcy was also observed in the heterozygous subjects, contrary to what was observed in studies performed in Western countries. This may be related to a synergistic influence of the high prevalence of folate deficiency in our population (20, 21). The impairment of Hcy remethylation as a result of folate deficiency was potentiated by the *MTHFR* 677 *TT* genotype in one-quarter of the subjects from group C2, as observed previously in white populations (20, 21). Several studies have reported that the 677C→T mutation has a significantly heterogeneous distribution among different ethnic groups (22, 23). In 2 recent studies of Mexican populations, who are known to have a relatively high frequency of neural tube defects, the percentage of 677 *TT* homozygotes was > 30% (24, 25). In contrast, Loktionov et al (26) found no homozygous 677 *TT* individuals among black Africans in a study comparing the frequency of the *MTHFR* 677C→T polymorphism between white and black South Africans. Plasma homocysteine concentrations were not evaluated in any of these comparative studies. The studies carried out in whites from Europe showed a North-to-South gradient, with a low allele frequency of 0.23 in the Baltic countries compared with an average frequency of 0.32 in the other regions (16) and of 0.42 in Sicily (15). In addition, it was recently suggested that the 677C→T mutation had occurred once on a *G-T-A-C* haplotype common to populations from Israel, Japan, and Ghana and that it may confer a survival advantage in populations with adequate folate intake (18). Considering our results on folate status and the dramatic synergic effect of folate deficiency and the *MTHFR T* allele on tHcy, this advantage could be limited in Africans because of a higher prevalence of folate deficiency and of infectious diseases, both of which impair folate assimilation (18, 27).

Cystatin C was another strong determinant of tHcy in the present study in the whole population but not in group C2. In a recent study of subjects from the savanna and coast of Togo, we showed that blood concentrations of cystatin C were not influenced by nutritional status (28). This protein is a marker of glomerular filtration and its association with tHcy has been described in healthy subjects and in patients with renal failure (29). Albumin and retinol-binding protein were 2 weak determinants of tHcy in the whole population and in group C1, respectively. These associations may reflect an influence of deficient nutritional status on tHcy, because these 2 proteins are sensitive markers of malnutrition (28). Uric acid was also a determinant of tHcy in group C1. This is not surprising because uric acid is an end product of tHcy catabolism (1). Of the subjects from the coast with tHcy concentrations > 28 μmol/L, 33% had the wild-type *MTHFR* 677 *CC* genotype, folate and vitamin B-12 concentrations higher than the lower quartile, and a normal blood concentration of cystatin C, suggesting the involvement of another determinant. This determinant was not related to the *MTHFR* 1298A→C and *MTR* 2756A→G mutations because these polymorphisms were not related to the high tHcy concentration of the subjects from the coast. In addition, the percentage of *MTHFR* 1298 *CC* homozygotes was largely below that reported in white populations, and the frequency of the *MTR* 2756 *G* allele was similar to that commonly reported in the other ethnic groups (30, 31).

In conclusion, we observed a high prevalence of moderate hyperhomocysteinemia in Western Africa. High tHcy concentrations were predominant on the coast, but not in the savanna, and were mainly related to folate deficiency, the presence of the *MTHFR* 677 *T* allele, and a still unknown determinant. This study highlights the need to study the effect of hyperhomocysteinemia and folate deficiency on diseases encountered in this area to evaluate whether systematic supplementation with folate is warranted.

We thank F Toukourou, the director of the Centre Beninois de la Recherche Scientifique et Technique, for support of the work in Benin.

EKA was responsible for study design, data collection, data analysis, and writing of the manuscript; NWC, CEA, RMR-G, CV, and FF were responsible for data analysis; AS was responsible for data collection and data analysis; and J-LG was responsible for study design, data analysis, and writing of the manuscript. None of the authors had a financial or personal interest in any organization sponsoring the research.

REFERENCES

1. Bollander-Gouaille C. Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism. 2nd ed. Paris: Spinger-Verlag, 2002.
2. Carmel R, Green R, Jacobsen WD, Rasmussen K, Florea M, Azen C. Serum cobalamin, homocysteine, and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities. Am J Clin Nutr 1999;70:904–10.
3. Stabler SP, Allen HR, Fried PL, et al. Racial differences in prevalence of cobalamin and folate deficiencies in disabled elderly women. Am J Clin Nutr 1999;70:911–9.
4. Ubbink JB, Deport R, Vermaak WJ. Plasma homocysteine concentrations in a population with a low coronary heart disease prevalence. J Nutr 1996;126(suppl):1254S–7S.
5. Mudd SH, Levy HL, Skovky JR. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle DL, eds. The metabolic and molecular basis of inherited disease. Vol 2. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995:1279–327.
6. Rosenblatt DS. Inherited disorder of folate transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle DL, eds. The metabolic and

molecular basis of inherited disease. Vol 2. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995:3111–28.
7. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Mol Genet Metab 1998;64:169–72.
8. Kluijtmans LA, van den Heuvel LPNJ, Boers G, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a risk factor for cardiovascular disease. Am J Hum Genet 1996;58:35–41.
9. Legnani C, Palareti G, Grauso, et al. Hyperhomocysteinemia and a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation in patients with inherited thrombophilic coagulation defects. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:2924–9.
10. Arruda VR, Von Zuben PM, Chiapirini LC, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. The mutation ala-677-val in the methylenetetrahydrofolate reductase gene as a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. Thromb Haemost 1997;77:818–21.
11. Van der Put NMJ, Grabeels F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube-defects? Am J Hum Genet 1998;62:1044–51.
12. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cbl*G* complementation group of folate/cobalamin disorders. Hum Mol Genet 1996;5:1867–71.
13. Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ. Differences in methylene-tetrahydrofolate reductase genotype frequencies between whites and blacks. Am J Hum Genet 1997;60:229–30.
14. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995;10:111–3.
15. Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, et al. Methionine synthase (MTR) 2756 (A→G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG and elevated homocysteine concentration are three risk factors for having a child with Down syndrome. Am J Med Genet 2003;121A:219–24.
16. Gudnason V, Standbie D, Scoot J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S. C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. Atherosclerosis 1998;136:347–54.
17. Botto LD, Yang Q. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am J Epidemiol 2000;151:862–77.
18. Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, et al. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. Am J Hum Genet 2002;70:758–62.
19. Enquêtes Budget Consommation (EBC). Phase urbaine, phase rurale. Lomé-Togo: Ministère du Plan, 1990 (in French).
20. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. Trends Pharmacol Sci 2001;22:195–201.
21. Guttmörsen AB, Ueland PM, Nesthus I, et al. Determinants and vitamins responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (>40 mmol/l). The Hordaland Homocysteine study. J Clin Invest 1996;9:2174–83.
22. Franco RF, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA Analysis of the 677C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. Thromb Haemost 1998;79:119–21.
23. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. Am J Hum Genet 1998;62:1258–60.
24. Lopez MA, Zuniga J, Granados J, Mutchinick OM. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene mutations in an inbred group of Mazateco Indians: an ethnic genetic marker for some Amerindian populations. Am J Hum Genet 1999;65S:1156 (abstr).
25. Mutchinick OM, Lopez MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. Mol Genet Metab 1999;68:461–7.
26. Loktionov A, Vorster H, O'Neill IK, et al. Apolipoprotein E and methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms in relation to other risk factors in UK Caucasians and black South Africans. Atherosclerosis 1999;145:125–35.
27. Rosenblatt DS, Whitehead VM. Cobalamin and folate deficiency: acquired and hereditary disorders in children. Semin Hematol 1999;36:19–34.
28. Pascal N, Amouzou EK, Sanni A, et al. Serum concentrations of sex hormone binding globulin are elevated in kwashiorkor and anorexia nervosa but not in marasmus. Am J Clin Nutr 2002;76:239–44.
29. Anwar A, Guéant JL, Abdelmouttaleb I, et al. Hyperhomocysteinemia is related to residual glomerular filtration and folate, but not to methylenetetrahydrofolate-reductase and methionine synthase polymorphisms, in supplemented end-stage renal disease patients undergoing hemodialysis. Clin Chem Lab Med 2001;39:747–52.
30. van der Put NMJ, van der Molen EF, Kluijtmans LAJ, et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural tube defects and vascular disease. Q J Med 1997;90:511–7.
31. Wang XL, Cai H, Cranney G, Wilcken DE. The frequency of a common mutation of the methionine synthase gene in the Australian population and its relation to smoking and coronary artery disease. J Cardiovasc Risk 1998;5:289–95.

Publication C

Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase *677T* and *1298C* alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations[1–3]

Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Jean-Louis Guéant, Renée Debard, Sylvie Thirion, Lu Xiao Hong, Jean-Pierre Bronowicki, Farès Namour, Nicodème W Chabi, Ambaliou Sanni, Guido Anello, Paolo Bosco, Corrado Romano, Emile Amouzou, Heidy R Arrieta, Beatríz E Sánchez, Antonino Romano, Bernard Herbeth, Jean-Claude Guilland, and Osvaldo M Mutchinick

ABSTRACT

Background: Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) *677C→T* polymorphism is heterogeneously distributed worldwide, with the highest and lowest frequencies of the *T* allele in Mexico and Africa, respectively, and a south-to-north gradient in Europe. Distribution of *MTHFR 1298A→C* is less well known. It has been hypothesized that *677T* frequency could result in part from gene-nutrient interactions.

Objective: The objective was to compare the association of *677T* and *1298C* alleles with plasma concentrations of homocysteine, folate, and vitamin B-12 in geographical areas with contrasting *677T* allele frequencies.

Design: Healthy young adults (n = 1277) were recruited in Mexico City, the West African countries of Bénin and Togo, France, and Sicily (Italy). Homocysteine, folate, and vitamin B-12 were measured in plasma, and *MTHFR* polymorphisms were measured in genomic DNA.

Results: Mexico City and Sicily reported the highest and Bénin and Togo reported the lowest plasma concentrations of folate. Mexico City had the highest *677T* allele prevalence and the lowest influence of *677TT* genotype on homocysteine, whereas the opposite was observed in Africa. The prevalence of the *1298C* allele was lowest in the Mexicans and Africans and highest in the French. The percentage of the *677T* genotype was significantly associated with the folate concentrations in *677CC* carriers in a univariate analysis ($R = 0.976$; 95% CI: 0.797, 0.996; $P < 0.0002$) and in a multiple regression model that included homocysteine, vitamin B-12, and age ($P = 0.0002$).

Conclusion: Our data agree with the hypothesis of a gene-nutrient interaction between *MTHFR 677C→T* polymorphism and folate status that may confer a selective advantage of *TT*-homozygous genotype when dietary intake of folate is adequate, at least in the areas studied. *Am J Clin Nutr* 2006;83:701–7.

KEY WORDS Methylenetetrahydrofolate reductase, polymorphism, folate, homocysteine, vitamin B-12

INTRODUCTION

Homocysteine is a non-protein-forming sulfur amino acid of one carbon metabolism that results from the demethylation of *S*-adenosylmethionine. Plasma concentrations of total homocysteine (tHcy) are influenced by nutritional predictors that include folate and vitamin B-12 and by polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase [(MTHFR) *MTHFR 677C→T* and *1298A→C*] (1, 2). MTHFR catalyzes the synthesis of 5-methyltetrahydrofolate, the methyl donor for the vitamin B-12–dependent remethylation of homocysteine to methionine. The *677TT* genotype, which leads to a substitution of an alanine residue for a valine residue in the amino acid consensus sequence, encodes for a thermolabile variant that reduces enzyme activity by 70% and increases tHcy, at least in the case of low dietary folate (1-3). Consequently, the *677C→T* polymorphism is a key genetic predictor of 2 major functions of the one-carbon metabolism, DNA synthesis and DNA methylation, whose effects are modulated by folate status (4). Double *677CT/1298AC* heterozygosity was found to be associated with moderate hyperhomocysteinemia, particularly in persons with low blood folate concentrations (5).

It may be that the *MTHFR 677C→T* polymorphism was produced by a single ancestral mutation, because it is strongly associated with a common haplotype of the gene (6). Its worldwide distribution is very heterogeneous: the highest and the

[1] From INSERM U-724, Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, Faculté de Médecine, University Henry Poincaré of Nancy, Vandoeuvre lès Nancy, France (R-MG-R, J-LG, RD, ST, LXH, J-PB, and FN); the Laboratory of Biochemistry and Nutrition, Lomé, Togo (NWC and AS); the IRCCS, Oasi Maria SS–Institute for Research on Mental Retardation, Troina, Italy (GA, PB, and CR); the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University of Cotonou, Cotonou, Bénin (EA); the Department of Genetics, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico(HRA, BES, and OMM); the Department of Internal Medicine and Geriatrics, Universitá Cattolica del Sacro Cuore, Complesso Integrato Columbus, Rome, Italy (AR); the Preventive Health Care Center and INSERM U525, Nancy, France (BH); and the Department of Physiology and Nutrition, University of Burgundy, Dijon, France (J-CG).

[2] Supported by grants from the Conseil Régional de Lorraine, the Fondation de France, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Ministère de la Recherche et de la Technologie, and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT - M0237) México.

[3] Address reprint requests and correspondence to J-L Guéant, INSERM U-724, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré, BP 184, 54500, Vandoeuvre lés Nancy, France. E-mail: Jean-Louis.Gueant@medecine.uhp-nancy.fr.

Received April 21, 2005.
Accepted for publication November 23, 2005.

lowest *T* allele prevalences are reported in Mexico and sub-Saharan Africa, respectively (7–12). A north-to-south gradient of allele *677T* prevalence has been observed in Western Europe, and the highest frequency occurs in Sicily (13). The mechanisms generating this gradient are not known and could involve, at least in part, gene-nutrient interactions. Folate intake is lower in the diet of Northern Europe than in that of Mediterranean countries (14–18). It was therefore hypothesized that dietary folate is one of the factors that has influenced the prevalence of *T* allele in Europe (1). Indeed, the *T* allele is associated with a greater risk of genetic birth defects, but that risk seems to be neutralized by a diet rich in folate (14). Two studies evaluated the worldwide distribution of the *T* allele, one in adults (11) and the other in newborns (12). However, the efforts to test the validity of the above hypothesis have not included evaluation of the respective relation of the allele with homocysteine and its 2 main nutritional predictors, folate and vitamin B-12, in geographical areas with contrasting *677T* allele frequencies. In the current study, we examined the distribution of allele frequencies of the 2 polymorphisms of *MTHFR* in a country with a high *677T* allele frequency (Mexico), 2 countries with an intermediate frequency [Italy (Sicily) and France], and 2 countries with a low frequency (Benin and Togo), and we evaluated the association of these distributions with folate and 2 other markers of homocysteine metabolism, tHcy and vitamin B-12.

SUBJECTS AND METHODS

Recruitment of subjects

The study was carried out in a population sample of 1277 healthy persons. All subjects were examined medically before inclusion and recruited on the basis of absence of any known disease. Particular attention was given to the absence of reported cancer; of cardiovascular, renal, hepatic, or genetic disease; and of vitamin supplementation. The 300 volunteers from Mexico were blood donors at the National Institute of Medical Sciences and Nutrition in Mexico City. The 146 volunteers from Sicily were from the rural area around the village of Troina in the northeastern part of Sicily, and they attended the medical center in Troina for preventive care. The 366 apparently healthy volunteers from France were recruited either in the northeast (Lorraine) or east (Burgundy and Franche Comté). A total of 195 volunteers was recruited in Togo, including 127 volunteers from the coast (Lomé) and 68 from the interior savanna. The 270 volunteers from Benin were recruited in the coastal city of Cotonou. Part of the African population was described previously (8).

Written informed consent was obtained from subjects. Institutional review board approval was obtained from the ethics committees of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition (Mexico City, Mexico), the medical center of Troina [IRCCS Associazione Oasi Maria SS, Troina (Sicily), Italy], the University Hospital Center of Nancy (Nancy, France), the University of Bénin (Lomé, Togo), and the University of Cotonou (Cotonou, Bénin).

Biological and genetic analyses

All specimens were tested in a single laboratory (Nancy, France). Fasting venous blood was collected in EDTA-containing tubes and, after immediate centrifugation, aliquots were stored at −70 °C until analysis. Plasma tHcy concentrations (protein-bound and free homocysteine) were determined by using the fluorescence polarization immunoassay (FPIA IMx-homocysteine method; Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL). Plasma vitamin B-12 and folate concentrations were assayed by using a VB12 and Folates immunoassay kit on an ACS 180 automated chemiluminescent system (both: Bayer Health Care Diagnostics, Cergy Pontoise, France) with threshold values established at 100 pmol/L and 7 nmol/L, respectively, according to World Health Organization criteria (1). Buffy coat was prepared from the previously collected blood, and genomic DNA was isolated with the use of a kit according to the manufacturer's recommendations (Qiagen-France, Courtaboeuf, France). A polymerase chain reaction–based RFLP method was used to determine the genotypes of *MTHFR*, as described previously (3, 5, 13). The *677C→T* polymorphism creates a *Hinf* I recognition site in a 198-bp amplified DNA fragment that was used to differentiate the various genotypes: *677CC, 677CT*, and *677TT*. The *MTHFR 1298A→C* polymorphism was analyzed by using a previously described protocol (13). The enzyme *Fnu4H*I cuts the amplified DNA of *C* allele carriers. Electrophoresis with 15% polyacrylamide gel showed a single 138-bp fragment for the *1298AA* homozygotes, two 119- and 19-bp fragments for the *1298CC* homozygotes, and three 138-, 119-, and 19-bp fragments for the *1298AC* heterozygotes.

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies were reported as percentages and 95% CIs. A continuity-corrected chi-square test and Bonferroni adjustment were used to assess differences between groups. Continuous variables were reported as medians and 25th and 75th percentiles. A Student's *t* test for unpaired data and Bonferroni adjustment were used to compare continuous variables. In the case of skewed data distributions, logarithmic transformations were carried out to normalize the distributions. Univariate regression analyses were performed by transformed correlation (Fisher *z* transformation) and stepwise multiple regressions with models that included age, tHcy, vitamin B-12, and folate. A P value ≤ 0.05 was considered significant. Data were analyzed by using STATVIEW for WINDOWS software (version 5.0.0.0; SAS Institute Inc, Berkeley, CA) and EPIINFO for MS-DOS software (version 6.0; World Health Organization, Geneva, Switzerland).

RESULTS

As expected, the highest and lowest frequencies of the *677T* allele and the *677TT* genotype were observed in Mexico and West Africa, respectively (**Table 1**). The *T* allele was also significantly more frequent in Sicily than in France (Table 1). We found no significant difference in *T* allele frequency [36.1% (95% CI: 28.7%, 44.2%) and 36.0% (31.2%, 40.8%); $P = 0.6725$] or *677TT* genotype [13.9% (7.8%, 23.8%) and 14.3% (9.9%, 19.8%); $P = 0.9262$] between the subsets of the French population from the northeastern and eastern parts of France, respectively. West African countries and Mexico were the 2 areas with the lowest frequencies of the *1298C* allele and the *1298CC* genotype, and the highest frequency was reported in France (Table 1). The distributions of the 3 genotypes of *MTHFR 677C→T* and *1298A→C* polymorphisms observed in the 7 areas

TABLE 1
Distribution of methylenetetrahydrofolate reductase *677C→T* and *1298A→C* polymorphisms in 1277 subjects from France, Italy, West Africa, and Mexico[1]

Geographical area	Age	*677C→T*		*1298A→C*		
		677 TT	*677T* allele	*1298CC*	*1298C* allele	*677CT/1298AC*
	y	%		%		%
West Africa (n = 465)	27 (24–37)[2]	0.8 (0.2, 2.1)[3,a]	9.0 (7.1, 11.2)[a]	1.9 (0.9, 3.9)[a]	13.9 (11.9, 16.5)[a]	3.4 (1.9, 5.8)[a]
Togo						
Coastal (n = 127)	25 (24–33)	1.6 (0.4, 5.5)	8.3 (5.5, 12.3)	2.4 (0.8, 6.7)	11.8 (8.4, 16.4)[1]	2.4 (0.8, 6.7)
Savannah (inland) (n = 68)	29 (27–34)	0.0 (0.0, 0.0)	5.9 (3.0, 11.2)	4.4 (1.6, 12.2)	15.9 (10.3, 22.5)	2.9 (0.0, 10.1)
Coastal Benin (n = 270)	27 (24–40)	0.6 (0.1, 3.2)	10.0 (7.9, 14.5)	0.6 (0.1, 3.4)	20.1 (16.3, 26.4)	4.6 (5.7, 20.2)
France (n = 366)	36 (25–47)	14.2 (10.1, 18.9)[b]	36.1 (31.9, 40.5)[b]	11.5 (6.5, 18.2)[c]	35.7 (32.0, 40.4)[c]	26.5 (19.0, 35.1)[c]
Italy (Sicily) (n = 146)	31 (18–45)	19.9 (14.1, 23.0)[c]	47.3 (41.5, 53.0)[c]	7.5 (4.0, 12.6)[b]	28.1 (23.0, 33.9)[b]	30.8 (23.3, 38.1)[c]
Mexico City (n = 300)	32 (36–41)	35.7 (29.9, 41.4)[d]	58.0 (53.8, 62.2)[d]	2.3 (0.9, 4.6)[a]	14.7 (11.8, 17.9)[a]	15.0 (10.9, 19.5)[b]

[1] Means with different superscript letters are significantly different, $P < 0.05$ (continuity-corrected chi-square test and Bonferroni adjustments). Coastal Togo compared with coastal Benin, $P = 0.006$.
[2] Median; 25th–75th percentiles in parentheses (all such values).
[3] $\bar{x}$; 95% CI in parentheses (all such values).

of recruitment did not differ significantly from those expected under Hardy-Weinberg equilibrium (data not showed).

The plasma concentrations of tHcy, folate, and vitamin B-12 are shown in **Table 2**. Mexico had the highest folate concentration, and the concentration did not differ significantly between France and Sicily. The highest concentrations of tHcy and the lowest concentrations of folate were registered in West African countries. The highest rate of folate deficiency was recorded in Togo, and the lowest rate was recorded in Mexico, when a threshold of 7 nmol/L is used (7; Table 2). In contrast, a low vitamin B-12 concentration (<100 pmol/L) was reported in 9.7% of the subjects from Mexico; this rate was significantly higher than that in subjects from France, Italy, and the African countries. Within Europe, tHcy and vitamin B-12 concentrations were significantly lower and higher, respectively, in Italy than in France (Table 2). In multiple regression analysis, folate was a significant independent predictor of tHcy in all of the areas, and tHcy was also associated with vitamin B-12 in Sicilians and Mexicans (**Table 3**). The *TT* genotype was associated with a dramatically higher concentration of tHcy in West Africans. It produced a mild but significant elevation of tHcy in France and Italy and no effect in Mexico (**Figure 1**). In contrast, the *677CT/1298AC* double heterozygosity did not have a significantly greater effect on total homocysteine than did the *677CT/1298AA* genotype [10.0 (7.9, 12.2) μmol/L and 10.0 (8.1, 14.0) μmol/L, respectively; P = 0.0952]. This finding was confirmed when the analysis was stratified by area.

We investigated whether the *677T* allele frequency was associated with folate status and other predictors of homocysteine metabolism in the 7 areas (**Table 4**). In univariate analysis, we found a correlation between the *T* allele frequency and, in order of significance, the median folate, tHcy, and vitamin B-12 concentrations reported in the 7 areas. The association of the *T* allele

TABLE 2
Plasma concentrations of homocysteine, folate, and vitamin B-12 in 1180 subjects from France, Italy, West Africa, and Mexico[1]

Area	Homocysteine	Folate	Subjects with <7.0 nmol/L folate	Vitamin B-12	Subjects with <100 pmol vitamin B-12
	μmol/L	*nmol/L*	%	*pmol/L*	%
West Africa (n = 368)	13.5 (10.0–20.1)[2,c]	9.1 (6.7–13.3)[a]	26.4 (22.0–31.0)[3,c]	463 (320–662)[c]	0.8 (0.2–2.1)[a]
Togo					
Coastal (n = 68)	14.0 (10.4–22.6)[4]	8.1 (5.9–12.3)[5]	36.8 (26.0–48.4)[6]	522 (377–706)[7]	0.0 (0.0–4.2)
Savannah (inland) (n = 127)	11.7 (9.7–16.2)[8]	8.4 (5.7–12.3)	33.9 (26.0–42.3)	551 (344–728)	0.0 (0.0–2.3)
Coastal Benin (n = 173)	14.1 (9.6–22.0)	10.1 (7.6–14.1)	16.2 (11.2–22.1)	406 (287–610)	1.7 (0.4–4.5)
France (n = 366)	10.0 (8.6–12.0)[b]	12.0 (9.7–15.2)[b]	6.3 (4.1–9.1)[b]	263 (185–365)[a]	3.6 (2.0–5.8)[b]
Northeastern (n = 131)	10.2 (8.4–11.9)	11.9 (9.7–15.3)	6.1 (2.8–11.1)	237 (171–330)	3.1 (0.9–7.0)
Eastern (n = 235)	10.0 (9.0–12.0)	12.0 (9.7–15.2)	6.4 (3.7–10.0)	271 (195–372)	3.8 (1.9–6.8)
Italy (Sicily) (n = 146)	8.3 (6.4–11.1)[a]	12.4 (9.3–17.4)[b]	4.8 (2.1–9.1)[b]	329 (242–432)[b]	1.4 (0.2–4.3)[a,b]
Mexico City (n = 300)	9.8 (7.6–12.1)[a]	17.2 (12.4–24.2)[c]	2.0 (0.8–4.0)[a]	294 (177–433)[a,b]	9.7 (6.7–13.3)[c]

[1] Student's t test for unpaired data and Bonferroni adjustment were used to compare concentrations; variables within a row with different superscript letters are significantly different, $P < 0.05$.
[2] Median; 25th–75th percentiles in parentheses (all such values).
[3] $\bar{x}$; 95% CI in parentheses (all such values).
[4] Significantly different from savannah, $P = 0.0047$ (continuity-corrected chi-square test and Bonferroni adjustments).
[5–8] Significantly different from coastal Benin (continuity-corrected chi-square test and Bonferroni adjustments): [5]$P = 0.0004$, [6]$P = 0.0010$, [7]$P < 0.0001$, [8]$P = 0.0219$.

TABLE 3
Backward stepwise multiple regression analysis of the predictors of plasma concentrations of homocysteine in populations from West Africa, France, Italy, and Mexico[1]

Area and independent predictor	*P*		
	Initial	Residual	β-coefficient
West Africa			
Age	0.5626		
Folate	<0.0001	<0.0001	−0.316
Vitamin B-12	0.4698		
France			
Age	0.9177		
Folate	0.0690	0.0064	−0.181
Vitamin B-12	0.3466		
Italy			
Age	0.1007		
Folate	<0.0001	<0.0001	−0.444
Vitamin B-12	0.0262	0.0118	−0.244
Mexico City			
Age	0.1770		
Folate	<0.0001	<0.0001	−0.299
Vitamin B-12	0.0161	0.0111	−0.142

[1] Stepwise multiple regression was performed with models that included age, vitamin B-12, and folate.

frequency with folate remained significant when the folate concentration of 677*CC* carriers was considered (Table 4). To avoid bias due to the effect of *TT* genotype on folate concentration, we considered the folate concentration only in 677*CC* homozygotes. A close inverse correlation was also found between *677T* allele frequency and the percentage of subjects with low plasma folate (<7 nmol/L) (**Figure 2**). Folate in *677CC* carriers and, to a lesser extent, tHcy were the 2 residual significant predictors of *T* allele frequency in a stepwise multivariate regression analysis that also included age and vitamin B-12 (Table 4). The same results were obtained when the association of folate concentration in *677CC* carriers with the frequency of *TT* genotype was considered (Table 4). In contrast, there was no significant association between the frequency of the combined *677CT/1298AC* genotype and plasma folate in *677CC* carriers ($P = 0.2450$).

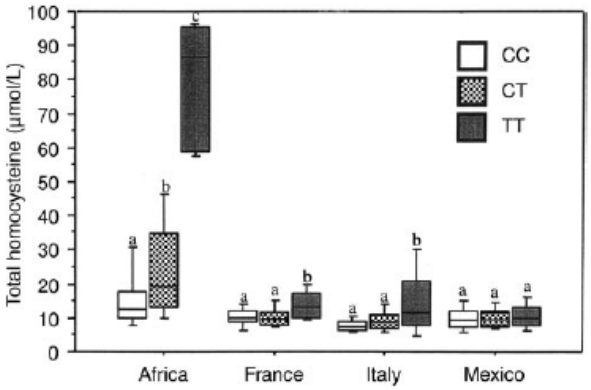


FIGURE 1. Homocysteine plasma concentrations (μmol/L; box plots represent medians, interquartiles, and range) according to the genotypes of methylenetetrahydrofolate reductase *677C→T* in West Africa ($n = 368$), Italy ($n = 146$), France ($n = 366$), and Mexico ($n = 300$). Student's *t* test for unpaired data and Bonferroni adjustment were used to compare the log-transformed total homocysteine of *CC*, *CT*, and *TT* genotypes within countries; boxes with different superscript letters were significantly different, $P < 0.005$.

DISCUSSION

The current study was performed on a population sample of reproductive age, which avoided any influence of a possible association of *677C→T* and *1298A→C* genetic polymorphisms with a risk of decreased longevity (19). As expected, the *T* allele frequency was highest in Mexico City, intermediate in eastern France and Sicily, and lowest in West Africa. The frequencies of the *677TT* genotype and the *677T* allele observed in Mexican and Sicilian newborns in a study by Wilcken et al (11) did not differ significantly from those we observed in young adults in Mexico ($P = 0.6429$) and Sicily ($P = 0.5619$). In the current study, such frequencies in newborns also did not differ significantly from those Wilcken et al (11) found or from the frequencies in young adults in northeastern France ($P = 0.9318$). Assuming that a very long-term change in the nutritional environment may influence *677T* and *1298C* allele frequencies in migrants, we found it interesting to compare the allele frequencies in young adults with

TABLE 4
Predictors of the frequency of *MTHFR 677T* allele and *677TT* genotype among 7 areas of West Africa, France, Italy, and Mexico in univariate and backward stepwise multiple regression analyses[1]

Dependent predictor	Univariate analysis			Multiple regression		
				P		
	P	β-coefficient	95% CI	Initial	Residual	β-coefficient
Frequency of *677T* allele						
Age	0.1961	0.555	−0.34, 0.92	0.3919	—	—
Homocysteine	0.0161	−0.847	−0.98, −0.26	0.0839	0.0419	−0.379
Folate	0.0015	0.943	0.65, 0.99	0.0379	0.0060	0.683
Vitamin B-12	0.0293	−0.804	−0.97, −0.13	0.6104	—	—
Frequency of *677TT* genotype						
Age	0.2453	0.507	−0.40, 0.91	0.6686	—	—
Homocysteine	0.0523	−0.750	−0.96, 0.01	0.1843	—	—
Folate	0.0002	0.976	0.80, 1.00	0.0106	0.0002	0.976
Vitamin B-12	0.0789	−0.702	−0.95, 0.11	0.4472	—	—

[1] The 7 areas are West Africa, coastal and savannah areas of Togo, coastal Benin, France, Sicily, and Mexico City. Regression analyses were performed by univariate and multiple regression with models that included age, total homocysteine, vitamin B-12, and folate in *MTHFR 677CC* carriers.

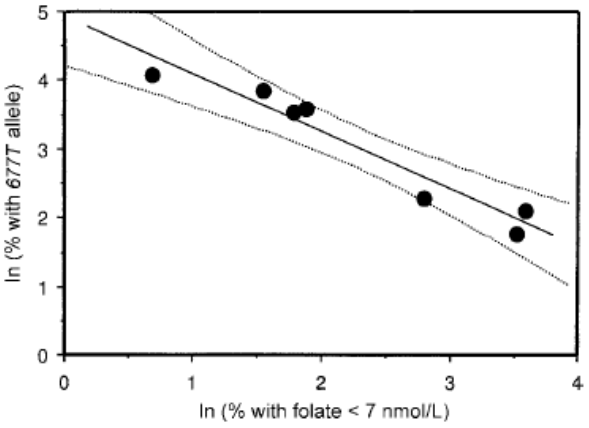


FIGURE 2. Correlation of the frequency of methylenetetrahydrofolate reductase *677T* allele (logarithm) with the percentage of subjects with folate deficiency (logarithm of the percentage of subjects with plasma folate < 7 nmol/L) in subjects from 7 areas (from right to left of the *x* axis): the coast ($n = 68$) and the savannah ($n = 127$) of Togo; the coast of Benin ($n = 173$); the northeastern ($n = 131$) and eastern ($n = 235$) regions of France; the island of Sicily ($n = 146$); and Mexico City ($n = 300$). $R = -0.940$, 95% CI: -0.994, -0.539; $P = 0.0027$. Dotted lines represent the 95% CI.

those published in newborns in corresponding migrant populations (11). We reported a *677T* allele frequency in Benin and Togo that was significantly lower than that in black newborns in Atlanta, GA [9.0% (95% CI: 7.1%, 11.2%) and 13.9% (11.2%, 17.1%), respectively; $P = 0.0269$] (Table 1; 8, 11). The *677T* allele in Hispanic newborns in Atlanta (41.1%; 95% CI: 32.8%, 49.8%) was also significantly less frequent than that reported in the young adults in our population ($P = 0.0006$; Table 1) and newborns [57.0% (95% CI: 53.9%, 60.0%); $P = 0.0008$] in another study in Mexico (11). These differences in allele frequency between migrant and settled populations may derive from differences in the study design or the age of the subjects studied, or from partial ethnic mixing. However, the influence of a change in gene pressure on the nutritional environment should be also considered.

Population genetic studies are one way to highlight geographical and ethnic differences that suggest evolutionary pressures generated by environmental factors. Such possible pressures on the nutritional environment remain speculative in the case of *MTHFR* polymorphisms. We evaluated the influence of the nutritional environment on ethnic differences in *MTHFR* variants by comparing populations that have different *T* allele frequencies and distinct traditional diets. Our results showed that the highest *T* allele frequency was in the area where influence of the *677TT* genotype on tHcy was the lowest (Figure 1 and Table 1), whereas the lowest frequency was registered in Africa, where the genotype influence on tHcy was the most evident. For example, a high tHcy concentration was observed in the 4 patients in Africa with a *677TT* genotype, and all of these patients had a low plasma concentration of folate and no other known genetic, metabolic, or nutritional characteristic that influenced tHcy.

In all 7 of the areas studied, we observed a close correlation of the *T* allele frequency with both the plasma concentration of folate and the percentage of persons with low plasma folate (Figure 2). Because we excluded the subjects who recurrently used vitamin supplements, the plasma folate concentration of *677CC* carriers can be considered a biological marker of short-term dietary folate intake. However, a limitation of the current study was that we could not consider the long-term effect of folate status on *T* allele frequency. Despite limited ethnic commonalities in these areas, the highest concentration of folate and the lowest rate of folate deficiency were recorded in the 2 areas, Mexico City and Sicily, that had the highest *T* allele frequency. In fact, the main similarity between those 2 populations is their typical diet, which is poorer in animal proteins than the so-called Western diet but much richer in wheat, corn, beans, lentils, and fresh fruit and vegetables (17, 18, 20). Therefore, it would be particularly interesting to compare the 2 diets to estimate the dietary intake and bioavailability of folate and other nutrients with respect to homocysteine metabolism. Several estimates in reference samples of European populations showed south-to-north decreasing gradients of dietary folate intake and of *T* allele frequency. For example, dietary folate was estimated at 190 μg/d in females in Netherlands, 268.2 $\pm$ 91.5 μg/d in females in northeastern or eastern France, and 323 $\pm$ 87 μg/d in nonelderly females in central Italy (14, 15, 17). The high prevalence of folate deficiency in West Africa may be involved in the evident phenotypic effect of *T* allele on tHcy, which showed interaction between the environment and genetic pressure (8). Indeed, up to 26.4% of the African population in the current study had a plasma folate concentration below the 7 nmol/L threshold, whereas only 2.0% of the Mexico City population did so (Table 2). However, 9.7% of the Mexican group had a vitamin B-12 concentration of <100 pmol/L, which confirmed the high rate of vitamin B-12 deficiency reported in a recent review of vitamin B status in the Americas (Table 2; 21). In addition, vitamin B-12 was a predictor of tHcy in the 2 populations with the highest folate status, ie, Sicilians and Mexicans (Table 2), as previously reported in subjects supplemented with folate (22).

The current study showed a high frequency of *MTHFR 677TT* in the presence of a high concentration of folate and a low frequency in the presence of low folate concentrations, but it could not ascertain whether *MTHFR* is an ancestral mutation. Rosenberg et al (6) showed that the *MTHFR 677T* variant has occurred on a common haplotype in Israelis, Japanese, and Ghanaians. They (6) and others (23) suggested that *MTHFR TT* homozygosity may confer a survival advantage in populations with adequate dietary folate consumption. Our data are in accord with this hypothesis. All of the subjects in the current study were healthy young adults, and thus the differences in *T* allele frequency may be related to a long-term influence of diet on birth defects rather than on pathologic conditions that occur late in life. However, the association of *MTHFR* mutations with the viability of embryo or fetus may be difficult to estimate, because most spontaneous abortions occur before pregnancy is diagnosed. A study found a survival advantage related to *MTHFR 677TT*, with a frequency in newborns 4-fold that in aborted fetuses (24). In contrast, an increased frequency of both *677T* and *1298C* mutated alleles has been reported in a series of spontaneously aborted embryos (25). Increased tHcy and related genetic predictors have also been implicated as risk factors for neural tube defects, Down syndrome, trisomy 18, and recurrent embryo losses (26–31), and these associations seem to be influenced by the geographical location and nutritional status of the subjects (30–32). For both neural tube defects and Down syndrome, *MTHFR* polymorphisms are risk factors in northern Europe, with its low-folate diet and low *677T* allele frequency, but are neutral in western and

southwestern Europe, where both dietary folate intake and *T* allele frequency are much higher (25, 26, 30–47). The risk of birth defects may be associated with other predictors of homocysteine metabolism interacting with *MTHFR* and folate. For example, the presence of *transcobalamin (TCN) 776G* allele and gene-gene interaction between *MTHFR 677TT* and *TCN 776G* allele have been found to increase the risk of spontaneous abortion in Greece (48, 49). *TCN 776C→G* is a gene polymorphism influencing the expression of transcobalamin, the protein responsible for cell delivery of vitamin B-12 (50). The benefit deriving from a high dietary intake of folate by *677T* allele carriers may be due to various mechanisms, such as the increased synthesis of purines and pyrimidines needed for DNA replication (2, 51). In addition, folate may neutralize the adverse cellular effects of the reduced activity of the thermolabile MTHFR variant, such as the defective remethylation of homocysteine, the subsequent DNA hypomethylation, and the uracile misincorporation (52). It may also influence epigenetic mechanisms regulating gene expression (53).

In 2 previous studies (54, 55), the *1298A→C* polymorphism in combination with *677C→T* appeared to affect enzyme activity and tHcy. However, the current study, as well as others (56–60)—including a biochemical study of the recombinant variants of MTHFR (60)—failed to find any association of the *677CT/1298AC* combined genotype with tHcy. Finally, we also failed to find any influence of folate on the distribution of this genotype in the 7 areas studied.

In conclusion, comparing populations that have greatly differing allele *677T* frequencies and folate status, we showed an association of *677T* allele frequency with both the folate plasma concentration and the percentage of folate deficiency in 7 areas on 3 continents. This observation supports the hypothesis of gene-nutrient interaction between *MTHFR* and folate status.

R-MG-R and J-LG contributed equally to the conception and design of the study, statistical analysis and data interpretation, and manuscript redaction. RD, ST, LXH, NWC, EA, GA, PB, HRA, and BES were responsible for the sampling, genotyping, and biological analyses. J-PB, FN, AS, EA, CR, AR, BH, and J-CG were responsible for local coordination of the study and recruitment of subjects in all areas except Mexico. OMM was responsible for local coordination of the study and recruitment of subjects in Mexico, for data interpretation, and for manuscript revision. J-LG was responsible for the general coordination of the study. None of the authors had any personal or financial conflict of interest.

REFERENCES

1. Bollander-Gouaille C. Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism. 2nd ed. Paris, France: Springer-Verlag, 2002.
2. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, et al. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. Trends Pharmacol Sci 2001;22:195–201.
3. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995;10:111–3.
4. Friso S, Choi SW, Girelli D, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction in the folate status. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:5606–11.
5. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? Am J Hum Genet 1998;62:1044–51.
6. Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, et al. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. Am J Hum Genet 2002;70:758–62.
7. Mutchinick OM, Lopez MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE. High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. Mol Genet Metabol 1999;68:461–7.
8. Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C→T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. Am J Clin Nutr 2004;79:619–24.
9. Ubbink JB, Christianson A, Bester MJ, et al. Folate status, homocysteine metabolism, and methylene tetrahydrofolate reductase genotype in rural South African blacks with a history of pregnancy complicated by neural tube defects. Metabolism 1999;48:269–74.
10. Rajkovic A, Mahomed K, Rozen R, Malinow MR, King IB, Williams MA. Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C→T polymorphism, plasma folate, vitamin B(12) concentrations, and risk of preeclampsia among black African women from Zimbabwe. Mol Genet Metabol 2000; 69:33–9.
11. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, et al. Geographical and ethnic variation of the 677C→T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. J Med Genet 2003;40:619–25.
12. Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B, et al. Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. Am J Hum Genet 1998;63:917–20.
13. Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, et al. In Sicily, methionine synthase (MTR) 2756 (A→G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. Am J Med Genet 2003;121:219–24.
14. Zetterberg H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. Reprod Biol Endocrinol 2004;2:7.
15. de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20–65 y. Am J Clin Nutr 2001;73:1027–33.
16. Mennen LI, de Courcy GP, Guilland JC, et al. Homocysteine, cardiovascular disease risk factors, and habitual diet in the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. Am J Clin Nutr 2002;76:1279–89.
17. Kushi LH, Lenart EB, Willett WC: Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge. 1. Plant foods and dairy products. Am J Clin Nutr 1995;61(suppl):1407S–15S.
18. Turrini A, Saba A, Perrone D, Cialfa E, D'Amicis A. Food consumption patterns in Italy: the INN-CA Study 1994–1996. Eur J Clin Nutr 2001; 55:571–88.
19. Panza F, D'Introno A, Colacicco AM, et al. Vascular genetic factors and human longevity. Mech Ageing Dev 2004;125:169–78.
20. Cavantes EI, Mutchinick OM. Defectos de cierre del tubo neural y nutrición materna: estudio multicéntrico en una muestra de la boblación Mexicana. (Neural tube defects and maternal nutrition. Multicentric study in a Mexican population.) Doctoral dissertation. National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico, 1999 (in Spanish).
21. Allen LH. Folate and vitamin B12 status in the Americas. Nutr Rev 2004;62:S29–33.
22. Quinlivan EP, McPartlin J, McNulty H, et al. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. Lancet 2002;359:227–8.
23. Munoz-Moran E, Dieguez-Lucena JL, Fernandez-Arcas N, Peran-Mesa S, Reyes-Engel A. Genetic selection and folic acid intake during pregnancy. Lancet 1998;352:1120–1.
24. Isolato PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. Am J Hum Genet 2000;67:986–90.
25. Zetterberg H, Regland B, Palmér M, et al. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. Eur J Hum Genet 2002;10: 113–8.
26. van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. Lancet 1995;346:1070–1.
27. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, et al. Abnormal folate metabolism

and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene may be maternal risk factors for Down syndrome. Am J Clin Nutr 1999;70:495–501.
28. Nelen WL, Steegers EA, Eskes TK, Blom HJ. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. Lancet 1997;350:861 (letter).
29. Lissak A, Sharon A, Fruchter O, Kassel A, Sanderovitz J, Abramovici H. Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss. Am J Obstet Gynecol 1999;181:126–30.
30. Gueant JL, Candito M, Andres E, Van Obberghen E, Nicolas JP. Familial pernicious anaemia with hyperhomocysteinaemia in recurrent early pregnancy loss. Thromb Haemost 2004;92:1147–9.
31. Kumar KS, Govindaiah V, Naushad SE, Devi RR, Jyothy A. Plasma homocysteine levels correlated to interactions between folate status and methylene tetrahydrofolate reductase gene mutation in women with unexplained recurrent pregnancy loss. J Obstet Gynaecol 2003;23:55–8.
32. Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, et al. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? Clin Chem Lab Med 2003;41:1473–7.
33. de Franchis R, Sebastio G, Andria G, Mastroiacovo P. Spina bifida, 677TT mutation, and role of folate. Lancet 1995;346:1703 (letter).
34. Papapetrou C, Lynch SA, Burn J, Edwards YH. Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. Lancet 1996;348:58 (letter).
35. de Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, et al. The C677T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. J Med Genet 1998;35:1009–13.
36. Guéant-Rodriguez RM, Rendeli C, Namour B, et al. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects. Neurosci Lett 2003;344:189–92.
37. Stegman K, Ziegler A, Ngo ET, et al. Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD). Am J Med Genet 1999;87:23–9.
38. Whitehead AS, Gallagher P, Mills JL, et al. A genetic defect in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. QJM 1995; 88:763–6.
39. Christensen B, Arbour L, Tran P, et al. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. Am J Med Genet 1999;84:151–7.
40. Shields DC, Kirke PN, Mills JL, et al. The "thermolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: an evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. Am J Hum Genet 1999;64:1045–55
41. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. Am J Hum Genet 2000;67:623–30.
42. Rosenblatt DS. Folate and homocysteine metabolism and gene polymorphisms in the etiology of Down syndrome. Am J Clin Nutr 1999;70: 429–30.
43. Hassold TJ, Burrage LC, Chan ER, et al. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. Am J Hum Genet 2001;69: 434–9.
44. O'Leary VB, Parle-McDermott AP, Molloy AM, et al. MTRR and MTHFR polymorphisms: link to Down syndrome? Am J Med Genet 2002;107:151–5.
45. Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR, et al. C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. Eur J Hum Genet 2002;10:388–90.
46. Chadefaux-Vekemans B, Coude M, Muller F, Oury J, Cali A, Kamoun P. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in the etiology of Down syndrome. Pediatr Res 2002;51:766–7.
47. Boduroglu K, Alanay Y, Koldan B, Tuncbilek E. Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. Am J Med Genet A 2004;127:5–10.
48. Zetterberg H, Regland B, Palmér M, et al. The transcobalamin codon 259 polymorphism influences the risk of human spontaneous abortion. Hum Reprod 2002;17:3033–6.
49. Zetterberg H, Zafiropoulos A, Spandidos DA, Rymo L, Blennow K. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C→T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. Hum Reprod 2003;18:1948–50.
50. Namour F, Olivier J, Abdelmouttaleb I, et al. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. Blood 2001; 97:1092–8.
51. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:3290–5.
52. Kapiszewska M, Kalemba M, Wojciech U, Milewicz T. Uracil misincorporation into DNA of leukocytes of young women with positive folate balance depends on plasma vitamin B-12 concentrations and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. A pilot study. J Nutr Biochem 2005;8:467–78.
53. Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF, et al. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. Lancet 2003;361:1693–9.
54. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Mol Gen Metab 1998;64:169–72.
55. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, et al. The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. Atherosclerosis 2001;156:409–15.
56. Lachmeijer AM, Arngrimsson R, Bastiaans EJ, et al. Mutations in the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine levels, and vitamin status in women with a history of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 2001;184:394–402.
57. Aldamiz-Echevarria L, Sanjurjo P, Vallo A, et al. Hyperhomocysteinemia in children with renal transplants. Pediatr Nephrol 2002;17:718–23.
58. Akar N, Akar E, Ozel D, Deda G, Sipahi T. Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke. Thromb Res 2001;102:115–20.
59. Guéant-Rodriguez RM, Juillière Y, Candito M, et al. Association of *MTRR A66G* polymorphism (but not of *MTHFR C677T* and *A1298C*, *MTR A2756G*, *TCN C776G*) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. Thromb Haemost 2005;94:510–5.
60. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;26:14853–8.

2. Allèle *776* du gène de la transcobalamine *(TCN 776C>G)* et statut en Folates et vitamine B12: étude comparative entre Afrique de l'ouest, Mexique, Chine, Maroc, Italie et France (Publication D)

2.1. Résultats

La distribution des génotypes du polymorphisme *TCN2 776 C>G* parmi les 7 populations est présentée dans le Tableau 1, publication D. Trois groupes contrastés pourraient être démontrés, selon la fréquence du génotype homozygote *776 GG*. La fréquence la plus élevée a été rapportée en Chine, ce génotype étant bien plus fréquent que le génotype *776 CC* dans cette population. On a observé une fréquence basse du génotype *776 GG* dans les populations d'Afrique occidentale (D, Tableau 2). En outre, on n'a observé aucune différence entre les sujets du Togo et ceux du Bénin, ni entre ceux de la côte du Togo et ceux de la savane. En revanche, une fréquence plus élevée de deux fois du génotype *TCN2 776 GG* a été rapportée chez les patients du Bénin avec la forme grave de malaria (6.0% [95%CI : 3.7-9.6], Figure 1). Une fréquence intermédiaire a été rapportée dans les populations européennes de France et d'Italie, au Maroc et au Mexique. Étonnamment, la fréquence du génotype de 776 GG chez les Afro-Américains n'était pas sensiblement différente de celle rapportée dans les populations caucasiennes (p = 0.8387), et elle était nettement plus haute que celle observée dans les sujets Afro-Africains (Tableau 1, p = 0.0004). Elle était du même ordre de grandeur que celle rapportée dans un autre groupe d'Afro-Américains des Etats-Unis nord-est [Bowen et al., 2004]. Par comparaison, la fréquence du génotype *MTHFR 677 TT* était semblable dans les deux populations africaines d'Afrique et New York occidentaux, avec la plus basse des fréquences des sept groupes, comme précédemment rapporté dans d'autres études [Amouzou et al., 2004]. Ceci indique que la différence dans la distribution du génotype 776

GG n'était pas due au brassage de groupes ethniques et que *MTHFR* et *TCN2* se sont comportés distinctement quant à l'influence de l'environnement sur leur distribution respective.

Les mêmes conclusions ont été obtenues en considérant les fréquences allèliques du polymorphisme *TCN2*, au lieu du génotype *TCN2* 776 GG. L'allèle de 776 G était l'allèle prédominant dans la population chinoise (*p<0.0001*), l'allèle le moins fréquent en Europe occidentale, régions méditerranéennes et au Mexique, et sa fréquence était nettement inférieure chez les sujets Afro-Africains que dans n'importe quel autre groupe ethnique (Tableau 2, p<0.0001). La fréquence de l'allèle de G étaient 2-fois inférieure chez les Afro-Africains, comparés aux Afro-Américains de New York (tableau 2, p = *0.0012*) et à la « somme » des Afro-Américains de New York et de l'étude de Bowen et autres (2004) (Tableau 2, *p<0.0001*). La fréquence d'allèle en France n'était pas différente de celle précédemment rapportée en Suède, en Hollande, en Irlande, en Grèce et dans les populations caucasiennes d'Amérique du Nord [Namour et al., 2001 ; Bowen et al.,2004 ; Swanson et alL, 2005 ; Lievers et al. 2001 ; Mc Caddon et al., 2001 ; Namour et al., 2001 ; Afman et al., 2002]. En revanche, elle était sensiblement plus élevée que celle rapportée en Sicile (p = *0.0084*) et au Mexique (p = *0.0161*). La distribution de l'allèle 677 T *MTHFR* parmi les 7 populations était semblable aux données de la littérature [Pepe et al., 1998 ; Amouzou et al., 2004]. En particulier, elle était du même ordre de grandeur chez les Afro-Africains d'Afrique occidentale et les Afro-Américains de New York. En outre, des résultats semblables ont été rapportés dans la population Afro-Africaine d'Atlanta [Wilcken et al., 2003]. Nous avons étudié l'hypothèse d'une influence de gène-gène *MTHFR* sur la distribution du polymorphisme *TCN2* et vice versa. Nous n'avons pas trouvé de différence de fréquence de *776 G* entre les sujets portant *MTFHR 677 T* et ceux portant l'allèle 677 C, dans n'importe laquelle de ces 7 populations. Il n'y avait aucune évidence de déséquilibre de Hardy-

Weinberg en Afrique occidentale, aux Etats-Unis nord-est, le Maroc, en France et en Italie (Chi-2: 0.0002. p = *0.989*, 2.619, p = *0.106*, 0.049, p = *0.825*, 1.869, p = *0.169*, 0.001, p= *0.920* ; 0.350. p = *0.554*, respectivement). En revanche, la fréquence des génotypes observés *TCN2* 776 CG était légèrement plus haute que prévue dans les échantillons de population provenant de la Chine et du Mexique et plus du double que prévu dans les patients africains présentant la malaria grave (Tableau 3 et Figure 1).

Il n'y avait aucune association entre l'allèle 776G et la concentration en homocystéine, en folates et en vitamine B12. Le niveau de plasma d'homocystéine était le plus élevé en Afrique, intermédiaire au Maroc, en France et le plus faible en à l'Italie et au Mexique, avec des valeurs respectives de 18.2 ±13.9, 11.4 ±3.2, 10.7 ±3.3, 9.9 ±5.9 et 10.3 ±3.7 µmol/L. Les folates sériques étaient les plus élevés au Mexique, intermédiaires en Italie, France et Maroc et le plus bas en Afrique avec des valeurs respectives de 19.5 ±9.4, 13.4 ±6.3, 12.8 ±5.0, 11.3 ±5.1 et 10.8 ±6.8 nmol/L. Par comparaison, le niveau de la vitamine B12 était le plus élevé en Afrique et le Maroc, intermédiaires au Mexique et l'Italie et le plus bas en France, avec des valeurs respectives de 662.4 ±506.4, 590.7 ±428.5, 422.7 ±658.8, 347.5 ±158.7 et 296.8 ±191.4 pmol/L. Le Mexique et la France étaient les deux pays où le percentage le plus élevé de concentration basse en vitamine B12 (< 100 pmol/L) a été rapporté, avec une fréquence respective de 9.3 et 3.7%. Il n'y avait aucun cas de carence en vitamine B12 en Italie et le Maroc et la fréquence de carence en vitamine B12 était aussi basse que 0.8% en Afrique. L'influence phénotypique du polymorphisme *TCN2* 776 *C>G* sur l'homocystéine était semblable quelle que soit la concentration en vitamine B12.

2.2. Discussion

Notre étude démontre une hétérogénéité dans la distribution allèlique du polymorphisme *TCN2 776 C>G* dans le monde entier, avec la fréquence d'allèle G la plus élevée en Chine. Par comparaison, la fréquence d'allèle était respectivement 3.4-fois inférieur et 1.5-fois inférieur respectivement, dans les populations africaines et caucasiennes. L'allèle *776 G* était bien plus fréquent que l'allèle 776C en Chine. Nous n'avons pas observé de différence de fréquences d'allèle G parmi les populations caucasiennes de l'Europe occidentale et du secteur méditerranéen. Ces fréquences étaient également dans le même ordre de grandeur que ceux rapportés dans les populations caucasiennes d'Europe et d'Amérique du Nord. En revanche, on a observé une différence dramatique de la fréquence de l'allèle *776 G* entre les populations qui ont la même appartenance ethnique et qui ont été soumises à un environnement différent pendant plus de 150 ans, populations du Togo et du Bénin et Afro-Américains de New York et nord-est des Etats-Unis, respectivement [Wilcken et al., 2003 ; Guéant- Rodriguez et al., 2006 ; Bowen et al., 2004]. Les populations Afro-Africaines de New York et du nord-est des Etats-Unis sont originaires des régions côtières de l'Afrique occidentale. Cependant, elles ont eu une fréquence 2-fois plus élevée *TCN2* 776 G. Il est remarquable qu'on n'ait pas observé une telle différence avec *MTHFR* 677 T, montrant l'absence d'influence du brassage ethnique dans le groupe d'Afro-Américains. En outre, contrairement à ce qui a été récemment observé avec l'allèle *MTHFR* 677 T, il n'y avait aucune association entre la fréquence de *TCN2* 776 G et la vitamine B12 ou le statut folique. En outre, la fréquence de *TCN2* 776 G n'a pas été liée à son influence phénotypique sur l'homocystéine. La plus basse fréquence était observée dans les pays africains et en Sicile, dans les zones géographiques où ce polymorphisme n'a eu aucun effet sur la concentration de plasma d'homocystéine.

Le polymorphisme *TCN2* peut avoir une influence délétère sur des événements très tôt de la vie et sur le développement normal de l'embryon. La fréquence de l'allèle *TCN2 776 G* est sensiblement plus élevée dans les avortements spontanés des embryons, comparés à une population d'adulte de référence [Zetterberg et al., 2004 ; Zetterberg et al., 2002]. Les embryons qui avaient combiné *MTHFR* 677 TT et TN2 776 CG ou 776 GG ont un risque accru pour l'avortement spontané comparé aux embryons qui ont eu seulement un de ces génotypes [Zetterberg et al., 2003]. Au vu de sa distribution mondiale, l'influence phénotypique du polymorphisme *TCN2* semble ne pas être associée à son effet sur le métabolisme d'homocystéine. On a observé un effet de l'allèle *776 G* sur la concentration en homocystéine seulement au Mexique et en France, dans les deux populations qui ont eu le taux le plus élevé de carence en vitamine B12. En fait, nous avons précédemment démontré dans différentes lignées de cellules que ce polymorphisme était un déterminant de la concentration intracellulaire en transcobalamine [Namour et al., 1998 ; Namour et al., 2001]. Ce polymorphisme a eu une influence négative sur le niveau de transcription, menant nettement plus bas dans le variant 259RR que dans le variant 259PP.

Les facteurs environnementaux peuvent conférer un avantage sélectif ou exercer une pression sélective sur la fréquence de l'allèle *TCN2* 776 G, en considérant les différences observées en Afrique, dans les populations Afro-Américaines et en Chine. Un des facteurs qui peuvent exercer une pression pourrait être les apports alimentaires en vitamine B12. Cependant, cette hypothèse n'est pas soutenue par l'absence d'association entre la fréquence de l'allèle et le statut en vitamine B12 des groupes d'étude. En outre, on a observé la plus basse fréquence de *TCN2 776 GG* au Bénin et au Togo, deux pays où le polymorphisme n'a eu aucune influence sur la concentration en homocystéine. Une autre hypothèse est l'influence de ce polymorphisme sur des pathologies telles que les maladies d'infections. Parmi ces pathologies, la malaria est un bon candidat. Le *Plasmodium falciparum* utilise les substrats

du métabolisme des monocarbones [Nzila et al., 2005 (partie 1) ; Nzila et al., 2005 (partie 2)]. En outre, la vitamine cellulaire B12 est impliquée dans la synthèse du succinyl-CoA [Rosenblatt et al., 2001], le premier substrat de la voie de synthèse de l'hème, et l'hémoglobine est une molécule qui est cruciale pour la croissance du parasite dans l'érythrocyte. La prédominance de la malaria est très élevée en Afrique occidentale et nulle en Amérique du Nord-Ouest. Nous avons rapporté une plus grande fréquence du génotype de *776 GG* chez les patients présentant la malaria grave, comparée au groupe des sujets apparemment sains de la population du même secteur urbain de Cotonou, au Bénin. Les critères de la sévérité étaient ceux définis par l'OMS. En outre, un déséquilibre de distribution de génotype a été enregistré chez ces patients, présentant un pourcentage 2-fois plus élevé de génotype GG que prévu (Tableau 1). Ces données indiquent donc que la malaria peut exercer une pression sélective sur la fréquence du génotype *GG* chez les Afro-Africains, considérant que la mortalité pour la malaria au Bénin est une des plus élevée au monde, avec un taux de malaria compliquée estimé à 4.2% d'enfants [Wang et al., 2006]. Par comparaison la prédominance de la mortalité liée à la malaria est très basse dans la province de Hubei (Chine centrale) [Zhou et al., 2004] et elle est nulle à Mexico et en Europe. En outre il est remarquable que la plus basse fréquence de l'allèle *TCN2* 776 G en Europe ait été rapportée en Sicile, une région où la prédominance de la malaria était haute jusqu'au milieu du siècle dernier. En conclusion, la différence dramatique dans la fréquence de génotype GG entre Afro-Africains et Afro-Américains suggère que cette variante puisse conférer un avantage sélectif quand la pression sélective est enlevée ou absente. Ceci pourrait expliquer le déséquilibre de Hardy-Weinberg qui a été observé dans les volontaires en bonne santé du Mexique (Tableau 3).

En conclusion, nous avons observé une hétérogénéité mondiale de la distribution du polymorphisme *TCN2* 776C>G qui fournit des évidences pour son association avec des

facteurs environnementaux liés aux événements précoces de la vie. Un des facteurs environnementaux qui peuvent exercer une pression sélective, pourrait être la malaria dans la mesure où le génotype *TCN2* 776 GG est associé à la sévérité de cette maladie.

Publication D

ORIGINAL ARTICLE

Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C→G variant in the transcobalamin gene (*TCN2*)

Jean-Louis Guéant, Nicodème W Chabi, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Osvaldo M Mutchinick, Renée Debard, Corinne Payet, Xiaohong Lu, Christian Villaume, Jean-Pierre Bronowicki, Edward V Quadros, Ambaliou Sanni, Emile Amouzou, Bing Xia, Min Chen, Guido Anello, Paolo Bosco, Corrado Romano, Heidy R Arrieta, Beatríz E Sánchez, Antonino Romano, Bernard Herbeth, Wafaa Anwar, Fares Namour

J Med Genet 2007;**44**:363–367. doi: 10.1136/jmg.2006.048041

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to: Professor J-L Guéant, Inserm U-724, Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, Faculté de Médecine, University Henry Poincaré of Nancy, BP 184, 54500, Vandoeuvre lès Nancy, France; jl.gueant@chu-nancy.fr

Received 29 November 2006
Revised 3 January 2007
Accepted 4 January 2007
Published Online First 12 January 2007

Background: A 776C→G variant (dbSNP ID: rs1801198) in the transcobalamin gene (*TCN2*; MIM# 275350) decreases the cellular and plasma concentration of transcobalamin and thereby influences the cellular availability of vitamin B_{12}.
Objective: To evaluate the worldwide prevalence of this variant and its association with homocysteine plasma level.
Methods: The study was performed in 1433 apparently healthy subjects, including Afro-Americans and Afro-Africans and in 251 Afro-Africans participants with severe malaria.
Results: The frequencies of the 776G allele were the highest in China (0.607; 95% CI 0.554 to 0.659), low in West Africa (Bénin and Togo, 0.178; 0.154 to 0.206), and intermediate in France (0.445; 0.408 to 0.481), Italy (0.352; 0.299 to 0.409), Morocco (0.370; 0.300 to 0.447) and Mexico (0.374; 0.392 to 0.419). The 776G genotype was more frequent in Afro-Americans from New York (16.7; 8.4 to 30.7) and in Afro-African patients with severe malaria (6.0%; 95% CI 3.7 to 9.6) than in healthy Afro-African volunteers ($p=0.0004$ and $p=0.033$, respectively), while no difference was observed for *MTHFR* 677TT and 677T alleles. A disequilibrium of *TCN2* genotype distribution was recorded in patients with severe malaria, with a twofold higher *GG* genotype than expected ($p=0.010$). An association between the *TCN2* polymorphism and homocysteine was observed only in Mexico and France, the two countries with the highest rate of low plasma concentration of vitamin B_{12} (<100 pmol/l).
Conclusion: Given the dramatic heterogeneity of the 776G allele frequency worldwide, this polymorphism may be prone to a selective pressure or confers an evolutionary advantage in confronting environmental factors, one of which is malaria.

Accumulating evidence suggests that the metabolisms of homocysteine and vitamin B_{12} play a role in developmental disorders.[1] Homocysteine is a crosspoint substrate of the so-called one-carbon metabolism. This metabolism is crucial for DNA synthesis and repair, and for a wide range of transmethylation reactions, including those of DNA and histones that are implicated in the regulation of gene expression.[2] The concentration of homocysteine in humans is influenced by the dietary intake of folate and vitamin B_{12}, and by the polymorphisms in genes that encode enzymes or proteins involved in the specific transport of folate and vitamin B_{12}.[3] One of these enzymes, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), catalyses the synthesis of 5-methyltetrahydrofolate, the methyl donor for vitamin B_{12}-dependent re-methylation of homocysteine to methionine. A 677C→T variant (dbSNP ID rs1801133) of *MTHFR* (MIM# 607093) decreases by fourfold the catalytic rate of the enzyme and, consequently, increases t-Hcys, especially in low folate status.[4 5] This variant is also a genetic determinant of folate imbalance between DNA synthesis and/or methylation.[6] Its worldwide distribution is very heterogeneous, the highest and the lowest T allele frequency being reported in Mexico and sub-Saharan Africa, respectively.[7–9] It has been hypothesised that dietary folate is one of the factors that has influenced the prevalence of the 677T allele worldwide.[10 11]

Another common genetic polymorphism that influences homocysteine and vitamin B_{12} metabolisms is a 776C→G variant in the transcobalamin gene (*TCN2*, MIM# 275350) that results in the substitution of proline for arginine in codon 259 (dbSNP ID: rs1801198).[12 13] The *TCN2* 776G allele decreases the transcription and the cellular and plasma concentration of transcobalamin, the carrier protein which delivers vitamin B_{12} to cells.[13] The influence of the *TCN2* 776G allele on the cellular availability of vitamin B_{12} has been documented by its association with plasma apotranscobalamin, holotranscobalamin, homocysteine and methylmalonic acid, in Caucasians.[13–15] This polymorphism seems to be associated with an increased risk of spontaneous abortion.[16] The possibility of a gene–gene interaction between the *MTHFR* and *TCN2* polymorphisms has also been suggested in this context.[17] More recently, *TCN2* polymorphism was found to be associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate.[18] Taken together, these data suggest an association between the *TCN2* 776G allele and the pathological and developmental events of the very early steps of life. Whether this association is influenced by environmental factors is not known, and, if it were the case, it would be reasonable to predict its heterogeneous distribution in populations that are exposed to a contrasted environment. To address this issue, we therefore studied the worldwide distribution of the *TCN2* 776G allele in populations from Europe, Mediterranean area, West Africa, China and Mexico, and compared Afro-Africans from West Africa with

Abbreviation: MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase

Table 1 Worldwide distribution of *TCN2* 776C→G genotypes

Geographical area	Ethnicity	Number of subjects	Genotype counts, n, % (95% CI) *776CC*	*776CG*	*776GG*
Togo	Afro-Africans	195	134, 68.7 (62.0 to 74.9)	52, 26.7 (20.8 to 33.1)	9, 4.6 (2.2 to 8.2)
Bénin	Afro-Africans	214	142, 66.3 (59.9 to 72.4)	68, 31.8 (25.8 to 38.2)	4, 1.9 (0.6 to 4.3)
West Africa (Togo and Bénin)	Afro-Africans	409	276, 67.5 (62.8 to 71.8)	120, 29.3 (25.1 to 33.9)	13, 3.2 (1.9 to 5.4)
New York	Afro-Americans	42	21, 50.0 (35.4 to 64.5)	14, 30.3 (21.0 to 48.5)	7, 16.7 (8.4 to 30.7)
North East United States*	Afro-Americans	51	19, 37.2 (25.9 to 50.7)	27, 52.9 (39.5 to 19.9)	5, 9.8 (3.6 to 19.9)
New York and North-East United States	Afro-Americans	93	40, 43.0 (33.4 to 53.2)	41, 44.1 (34.4 to 54.2)	12, 12.9 (7.6 to 21.2)
Morocco	Arabs-Caucasians	81	35, 43.2 (33.0 to 54.1)	32, 39.5 (29.6 to 50.4)	14, 17.3 (10.6 to 29.0)
France	Caucasians	353	109, 30.9 (26.3 to 35.9)	174, 49.3 (44.1 to 54.5)	70, 19.8 (16.0 to 24.3)
Italy (Sicily)	Caucasians	142	58, 40.8 (33.1 to 49.1)	68, 47.9 (39.8 to 56.1)	16, 11.3 (7.1 to 17.5)
Mexico	Hispanics	239	102, 42.7 (36.6 to 49.0)	95, 39.7 (33.8 to 46.1)	42, 17.6 (13.3 to 22.9)
Central China	Hans	167	34, 20.4 (15.0 to 27.1)	63, 37.7 (30.7 to 45.3)	70, 41.9 (34.7 to 49.5)

*Data from Bowen *et al.*[19]

Afro-Americans. We also evaluated the influence of this variant on plasma homocysteine concentration in those populations that were accessible to plasma collection.

METHODS

The study was carried out on a population of 1433 apparently healthy participants, with an age range of 20–60 years. Ethical approval for study of DNA variants in the untraceable DNA samples was obtained through the Research Ethics Board of Troina (Sicily, Italy). Similarly, local approval was obtained for DNA samples from New York and China. All the other subjects were medically examined to rule out cancer, cardiovascular, renal, hepatic and genetic disease, and recurrent vitamin supplementation prior to inclusion in the study. Institutional review board approval was obtained from the ethical committees of the Medical Center of Troina (IRCCS Associazione Oasi Maria SS, Troina, Sicily, Italy), University Hospital Center of Nancy (Nancy, France), University of Bénin (Lomé, Togo), University of Cotonou (Cotonou, Bénin), Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion (Mexico DF, US of Mexico) and University Hospital of Casablanca (Morocco). Informed consent was obtained from the participants. The volunteers from Sicily were from a rural area, in the north-east of Sicily. Volunteers from Togo were recruited from the coast (Lomé) and the Savanna. They have already been described in a recent publication.[8] The volunteers from Bénin were recruited from the coastal urban area of Cotonou. The volunteers from Mexico were blood donors at the Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion and originated from the periphery of Mexico City, and those from China and New York were blood donors from the region of Wuhan and New York City, respectively. A group of 251 patients with severe malaria were also recruited from the University Hospital Center of Cotonou (Bénin). All blood specimens were tested in a single laboratory (Nancy, France). Fasting venous blood was collected in EDTA-containing tubes and, after immediate centrifugation, aliquots were stored at −30℃ until analysis. Plasma homocysteine concentrations (protein-bound and free homocysteine) were determined by the fluorescence polarisation immunoassay IMx-homocysteine method developed by Abbott (Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, Illinois, USA). Buffy coat was prepared from the previously collected blood and genomic DNA was isolated using the Qiagen kit (Qiagen-France, Courtaboeuf cedex, France). Plasma vitamin B_{12} and folate concentrations were determined by the immunoassay kit V B_{12} and Folates on an ACS 180 automated chemiluminescent system (Chiron Diagnostics Corporation, East Walpole, Massachusetts, USA), with threshold values established, respectively, at 100 pmol/l and 7 nmol/l, respectively.[11] Genotyping of the *TCN2* 776C→G polymorphism was performed by the amplification-refractory mutation system, as we described recently.[12] PCR-based restriction fragment length polymorphism method was used to determine the genotypes of *MTHFR*.[8] Allele and genotype frequencies were reported as percentages (95% CI), and a Fisher's test was used to assess differences between the groups. Continuous variables were reported as mean (SD). Comparisons of continuous variables were performed by Mann–Whitney U test. p Values <0.05 were considered significant. Data were prospectively collected and analysed using the SAS software v9.1 for Windows.

Table 2 *TCN2* 776G and *MTHFR* 677T allele frequencies worldwide

Geographical area	Ethnicity	Number of alleles	Allele frequency (95% CI) *TCN2* 776G	*MTHFR* 677T
Togo	Afro-Africans	390	0.179 (0.144 to 0.219))	7.4 (5.1 to 10.3)
Bénin	Afro-Africans	428	0.177 (0.143 to 0.216)	10.7 (5.1 to 10.3)
West Africa	Afro-Africans	818	0.178 (0.154 to 0.206)	0.093 (0.075 to 0.115)
New York	Afro-Americans	84	0.333 (0.242 to 0.440)	0.107 (0.057 to 0.191)
North-East United States*	Afro-Americans	102	0.363 (0.274 to 0.458)	
New York and North-East United States	Afro-Americans	186	0.349 (0.284 to 0.349)	
Morocco	Arabs-Caucasians	162	0.370 (0.300 to 0.447)	0.289 (0.218 to 0.373)
France	Caucasians	706	0.445 (0.408 to 0.481)	0.354 (0.318 to 0.392)
Italy (Sicily)	Caucasians	284	0.352 (0.299 to 0.409)	0.438 (0.382 to 0.496)
Mexico	Hispanics	478	0.374 (0.392 to 0.41.9)	0.581 (0.538 to 0.622)
Central China	Hans	334	0.607 (0.554 to 0.659)	0.392 (0.344 to 0.442)

*Data from Bowen *et al.*[19]

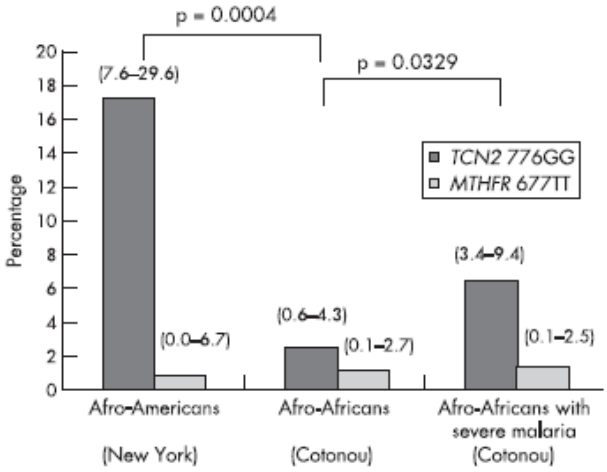


Figure 1 Comparison (by Fisher's test) of the frequency of *TCN2* 776GG and *MTHFR* 677TT in healthy volunteers from New York, Cotonou (Bénin) and in patients with severe malaria from Cotonou. 95% confidence intervals are indicated in brackets.

RESULTS

Table 1 presents the distribution of the genotypes of *TCN2* 776C→G polymorphism among the seven populations. The highest frequency was reported in China, this genotype being even more frequent than the 776CC genotype in this population. A low frequency of GG genotype was observed in the populations from West Africa (table 2).

In addition, no difference was observed between the participants from Togo and those from Bénin, nor between those from the coast of Togo and those from the Savannah. In contrast, a twofold higher frequency of *TCN2* 776GG genotype was reported in the patients from Bénin with severe malaria (6.0% (95% CI 3.7 to 9.6); fig 1). Surprisingly, the frequency of 776GG genotype in Afro-Americans was not significantly different from that reported in Caucasian populations ($p = 0.839$), but it was dramatically higher than that observed in the Afro-African participants (table 1; $p = 0.0004$). It was in the same order of magnitude as that reported in another group of Afro-Americans from north-eastern United States.[19] By comparison, the frequency of *MTHFR* 677TT genotype was similar in both African populations from West Africa and New York,[8] indicating that the difference in 776GG genotype was not due to crossbreeding.

The same contrasted groups were evidenced when considering the allele frequencies of *TCN2* polymorphism, instead of *TCN2* 776GG genotype. The 776G allele was the most predominant allele in the Chinese population ($p<0.001$), the less frequent allele in West Europe, Mediterranean areas and Mexico, and its frequency was dramatically lower in Afro-African participants than in participants of any other ethnicity (table 2; $p<0.001$). The 776G allele frequency was twofold lower in Afro-Africans, compared with Afro-Americans from New York (table 2; $p = 0.001$) and with the sum of Afro-Americans from New York and from the study of Bowen *et al*[19] (table 2; $p<0.001$). The allele frequency in France was not different from that previously reported in Sweden, The Netherlands, Ireland, Greece and the Caucasian populations from North America.[13 19–24] In contrast, it was significantly higher than that reported in Sicily ($p = 0.0084$) and in Mexico ($p = 0.0161$). The distribution of *MTHFR* 677T allele frequency among the seven populations was similar to previous reports of the literature.[7 8] In particular, it was in the same order of magnitude in the Afro-Africans from West Africa and in the Afro-Americans from New York. In addition, similar results were reported in the Afro-African population from Atlanta.[9] We investigated the hypothesis of a gene–gene influence of *MTHFR* on the distribution of *TCN2* polymorphism and vice versa. We failed to find any difference in 776G allele frequency between the subjects carrying the MTFHR 677T allele and those carrying the 677C allele in any of the seven populations. There was no evidence of Hardy–Weinberg disequilibrium of the genotype distribution in West Africa, north-eastern United States, Morocco, France and Italy (χ^2: 0.0002, $p = 0.989$; 2.619, $p = 0.106$; 0.049, $p = 0.825$; 1.869, $p = 0.169$; 0.001, $p = 0.920$ and 0.350, $p = 0.554$, respectively). In contrast, the frequency of observed *TCN2* 776CG genotypes was slightly higher than expected in the population samples from China and Mexico, and as much as twofold higher than expected in the African patients with severe malaria (table 3 and fig 1).

Table 3 Hardy–Weinberg disequilibrium in healthy volunteers from Mexico, China and in patients with severe malaria from Bénin

Geographical area	Genotype	Observed	Expected	χ^2	p Value (two tailed)
Mexico	CC	102	93.5	0.769	
	CG	95	112.0	2.572	
	GG	42	33.5	2.151	
Total				5.492	0.019
China	CC	34	25.7	2.696	
	CG	63	79.6	3.473	
	GG	70	61.7	1.119	
Total				7.288	0.007
Bénin—severe malaria	CC	172	165.8	0.232	
	CG	64	76.4	2.018	
	GG	15	8.8	4.367	
Total				6.617	0.010
Bénin — healthy volunteers					
	CC	142	144.7	0.052	
	CG	68	62.5	0.482	
	GG	4	6.7	1.114	
Total		214		1.648	0.199

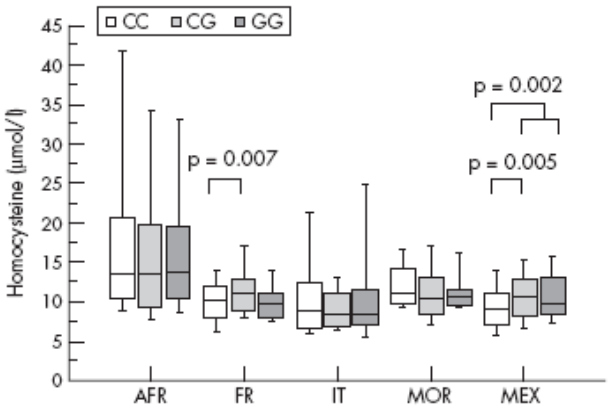


Figure 2 Plasma homocysteine level (box plots represent median, interquartiles and range) according to the genotypes of *TCN2* 776C→G in West Africa (AFR), Italy (IT), France (FR), Morocco (MOR) and Mexico (MEX).

The homocysteine plasma level was the highest in Africa, intermediate in Morocco and France, and the lowest in Italy and Mexico, with respective values of 18.2 (13.9), 11.4 (3.2), 10.7 (3.3), 9.9 (5.9) and 10.3 (3.7) µmol/l. The serum folate level was the highest in Mexico, intermediate in Italy, France and Morocco, and the lowest in Africa, with respective values of 19.5 (9.4), 13.4 (6.3), 12.8 (5.0), 11.3 (5.1) and 10.8 (6.8) nmol/l. By comparison, the vitamin B_{12} level was the highest in Africa and Morocco, intermediate in Mexico and Italy, and the lowest in France, with respective values of 662.4 (506.4), 590.7 (428.5), 422.7 (658.8), 347.5 (158.7) and 296.8 (191.4) pmol/l. We could evaluate the phenotypic influence of *TCN2* on homocysteine plasma concentration in the study groups, except for the subjects recruited from China and New York. An association between *TCN2* polymorphism and homocysteine was observed in the subjects from Mexico and France, but not in those from Italy, Morocco and Africa (fig 2).

DISCUSSION

Our study demonstrated a heterogeneity in the allele distribution of *TCN2* 776C→G polymorphism worldwide, with the highest 776G allele frequency reported in China. By comparison, the allele frequency was, respectively, 3.4-fold and 1.5-fold lower, in African and Caucasian populations. The 776G allele was even more frequent than the 776C allele in China. We did not observe any difference in 776G allele frequency among Caucasian populations from West Europe and the Mediterranean area. These frequencies were also in the same order of magnitude as those reported in Caucasian populations from North Europe and North America. In contrast, a dramatic difference of 776G allele frequency was observed between populations that have the same ethnicity. The Afro-African populations from New York and the north-east of the United States originated from the coastal regions of West Africa, respectively, as the populations from Bénin and Togo. However, they had a twofold higher frequency of *TCN2* 776G allele. It is noteworthy that such a difference was not observed with the *MTHFR* 677T allele, showing the absence of crossbreeding in the group of Afro-Americans. The *TCN2* 776G allele frequency was not related to its phenotypic influence on homocysteine, as the lowest frequency was observed in the African countries and in Sicily—for example, in areas where this polymorphism had no effect on homocysteine plasma concentration.

TCN2 polymorphism may have a deleterious influence on very early events of life and on the normal development of the embryo. The prevalence of the mutated *TCN2* 776G allele is significantly higher in spontaneous abortion of embryos, and the frequency of wild-type *TCN2* 776CC embryos is much lower among spontaneously aborted embryos, compared with a reference adult population.[1 16] Embryos that had combined *MTHFR* 677TT and TN2 776CG or 776GG genotypes are at increased risk for spontaneous abortion compared with embryos that had only one of these genotypes.[17] In addition, *TCN2* 776C→G was the single polymorphism associated with the onset of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate, in a recent study.[18] Contrasting results have been observed with regard to the association between *TCN2* 776C→G and the risk of neural tube defect, with no association reported in Ireland and The Netherlands and an increased risk in the cases with the predominant 677CC genotype of *MTHFR* polymorphism in Sicily.[20 24 25]

With regard to its worldwide distribution, the phenotypic influence of the *TCN2* polymorphism seems not to be primarily associated with its effect on homocysteine metabolism. An effect of the 776G allele on homocysteine concentration was observed only in Mexico and in France, in the two populations that had the highest rate of low concentration of vitamin B_{12}. In fact, we have previously shown in different cell lines that this polymorphism was a determinant of the intracellular concentration of transcobalamin.[12 13] This polymorphism had a negative influence on the transcription level, leading to a dramatically lower concentration of the transcript in the 259RR variant than in the 259PP variant.[12 13]

Environmental factors may confer a selective advantage or exert a selective pressure on the frequency of the *TCN2* 776G allele, with regard to the dramatic differences observed in Africa, in the Afro-American populations and in China. One of the factors that may exert a pressure could be the dietary intake of vitamin B_{12}, which is one of the strongest nutritional determinants of homocysteine metabolism. However, this hypothesis is not sustained by the lack of association between the allele frequency and the vitamin B_{12} status of the study groups. In addition, the lowest frequency of *TCN2* 776GG was observed in Bénin and Togo, two countries where the polymorphism had no influence on plasma homocysteine level. Another hypothesis could be the influence of this polymorphism on the gravity of pathologies such as diseases from infections in young populations. Among the pathologies, malaria is a good candidate for such an investigation. *Plasmodium falciparum* requires substrates of the one-carbon metabolism that are provided by the host.[26 27] In addition, cellular vitamin B_{12} is involved in the synthesis of succinyl-CoA,[28] the first substrate of the haeme pathway, and haemoglobin is a molecule that is crucial for the growth of the parasite within the erythrocyte. The prevalence of malaria is very high in West Africa and null in north-west America. We reported a twofold increased frequency of the 776GG genotype in patients with severe malaria, compared with the apparently healthy sample of population from the same urban area of Cotonou, in Bénin. The criteria of severity were those defined by the World Health Organization. In addition, a disequilibrium of genotype distribution was recorded in these patients, with a twofold higher rate of *GG* genotype than expected (table 1). Hence, these data indicated that malaria may exert a selective pressure on the frequency of *GG* genotype in Afro-Africans, considering that the mortality for malaria in Bénin is one of the highest in the world, with the rate of complicated malaria estimated at 4.2% of children.[29] By comparison, the prevalence of mortality related to malaria is very low in the province of Hubei (central China)[30] and is null in Mexico city and in Europe. In addition, it is noteworthy that the lowest frequency of the *TCN2* 776G allele in Europe was reported in Sicily, a region where the prevalence of malaria was high until the middle of the 20th century. Finally, the dramatic difference in GG genotype frequency between Afro-African and Afro-American populations suggests that this variant may confer a selective advantage when the selective pressure is removed or absent. This could explain the Hardy–Weinberg disequilibrium that was observed in healthy volunteers from Mexico, with the frequency of GC and GG genotypes higher than expected (table 3).

In conclusion, we have observed a worldwide heterogeneity in the distribution of the *TCN2* 776C→G polymorphism, which provides evidence for its association with environmental factors in early events of life. One of the environmental factors that may exert a selective pressure could be malaria, as the *TCN2* 776GG genotype was associated with the severity of this disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Conseil Régional de Lorraine, Fondation de France, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, French Ministère de la Recherche et de la Technologie and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT - M0237) México.

Authors' affiliations

Jean-Louis Guéant, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Renée Debard, Corinne Payet, Xiaohong Lu, Christian Villaume, Jean-Pierre Bronowicki, Fares Namour, Inserm U-724, Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, Faculté de Médecine, University Henry Poincaré of Nancy, Vandoeuvre lès Nancy, France
Osvaldo M Mutchinick, Heidy R Arrieta, Beatriz E Sánchez, Departamento de Genética, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico city, México
Edward V Quadros, Department of Biochemistry, SUNY-Downstate Medical Center, Brooklyn, New York, USA
Nicodème W Chabi, Ambaliou Sanni, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Université de Cotonou, Bénin
Emile Amouzou, Laboratory of Biochemistry and Nutrition, Lomé, Togo
Bing Xia, Min Chen, Department of Internal Medicine and Geriatrics, Zhongnan Hospital and Research Center of Digestive Diseases, Wuhan University Medical School, Wuhan, PR China
Guido Anello, Paolo Bosco, Corrado Romano, IRCCS, Oasi Maria SS–Institute for Research on Mental Retardation, Troina (EN), Italy
Antonino Romano, Department of Internal Medicine and Geriatrics, UCSC, Cl Columbus, Roma, Italy
Bernard Herbeth, Inserm U525, Nancy, France
Wafaa Anwar, Département de Biologie, Faculté de Médecine, Casablanca, Morocco

Competing interests: None.

REFERENCES

1 **Zetterberg H.** Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;**2**:7.
2 **Fowler B.** Homocysteine: overview of biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Semin Vasc Med* 2005;**5**:77–86.
3 **Bollander-Gouaille C.** *Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism*, 2nd edn. Paris: Spinger-Verlag, 2002.
4 **Frosst P**, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuve LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;**10**:111–13.
5 **Ueland PM**, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the *MTHFR* C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001;**22**:195–201.
6 **Friso S**, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivieri O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R, Selhub J. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction in the folate status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:5606–11.
7 **Pepe G**, Camacho Vanegas O, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M, Rickards O, De Stefano GF, Prisco D, Gensini GF, Abbate R. Heterogeneity in word distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1998;**63**:917–20.
8 **Amouzou EK**, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Guéant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, Guéant JL. High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C→T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr* 2004;**79**:619–24.
9 **Wilcken B**, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembic Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, Lopez MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martinez-Frias ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet* 2003;**40**:619–25.
10 **Munoz-Moran E**, Dieguez-Lucena JL, Fernandez-Arcas N, Peran-Mesa S, Reyes-Engel. Genetic selection and folic acid intake during pregnancy. *Lancet* 1998;**352**:1120–1.
11 **Guéant-Rodriguez RM**, Guéant JL, Debard R, Thirion S, Xiao Hong L, Bronowicki JP, Namour F, Chabi NW, Sanni A, Anello G, Bosco P, Romano C, Amouzou E, Heidy R, Arrieta B, Sánchez BE, Romano A, Herbeth B, Guilland JC, Mutchinick OM. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study among Mexican, West African and West European populations. *Am J Clin Nutr* 2006;**83**:701–7.
12 **Namour F**, Guy M, Aimone-Gastin I, de Nonancourt M, Mrabet N, Gueant JL. Isoelectrofocusing phenotype and relative concentration of transcobalamin II isoprotein related to the codon 259 Arg/Pro polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;**251**:769–74.
13 **Namour F**, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Guéant JL. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 2001;**97**:1092–8.
14 **Miller JW**, Ramos MI, Garrod MG, Flynn MA, Greeen R. Transcobalain II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. *Blood* 2002;**100**:718–20.
15 **Zetterberg H**, Nexo E, Regland B, Minthon L, Boson R, Palmer M, Rymo L, Blennow K. The transcobalamin (TC) codon 259 genetic polymorphism influences holo-TC concentration in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer disease. *Clin Chem* 2003;**49**:1195–8.
16 **Zetterberg H**, Regland B, Palmer M, Rymo L, Zafiropoulos A, Arvanitis DA, Spandidos DA, Blennow K. The transcobalamin codon 259 polymorphism influences the risk of human spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2002;**17**:3033–6.
17 **Zetterberg H**, Zafiropoulos A, Spandidos DA, Rymo L, Blennow K. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2003;**18**:1948–50.
18 **Martinelli M**, Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Baciliero U, Padula E, Carinci P, Morselli PG, Carinci F. Study of four genes belonging to the folate pathway: transcobalamin 2 is involved in the onset of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat* 2006;**27**:294.
19 **Bowen RA**, Wong BY, Cole DE. Population-based differences in frequency of the transcobalamin II Pro259Arg polymorphism. *Clin Biochem* 2004;**37**:128–33.
20 **Swanson DA**, Pangilinan F, Mills JL, Kirke PN, Conley M, Weiler A, Frey T, Parle-McDermott A, O'Leary VB, Seltzer RR, Moynihan KA, Molloy AM, Burke H, Scott JM, Brody LC. Evaluation of transcobalamin II polymorphisms as neural tube defect risk factors in an Irish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;**73**:239–44.
21 **Lievers KJA**, Afman LA, Kluitmans LAJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Trijbels FJ, Blom HJ. Polymorphism in the transcobalamin gene: association with plasma homocysteine in healthy individuals and vascular disease patients. *Clin Chem* 2002;**48**:1383–9.
22 **McCaddon A**, Blennow K, Hudson P, Regland B, Hill D. Transcobalamin polymorphism and homocysteine. *Blood* 2001;**98**:3497–9.
23 **Namour F**, Guéant JL. Transcobalamin polymorphism, homocysteine and ageing. *Blood* 2001;**98**:3497–9.
24 **Afmann LA**, Lievers KJ, van der Put NM, Trijbels FJ, Blom HJ. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. *Eur J Hum Genet* 2002;**10**:433–8.
25 **Guéant-Rodriguez RM**, Rendeli C, Namour B, Venuti L, Romano A, Anello G, Bosco P, Debard R, Gérard P, Viola M, Salvaggio E, Guéant JL. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects. *Neurosci Lett* 2003;**344**:189–92.
26 **Nzila A**, Ward SA, Marsh K, Sims P, Hyde JE. Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part I): pointers for malaria treatment from cancer chemotherapy. *Trends Parasitol* 2005;**21**:292–8.
27 **Nzila A**, Ward SA, Marsh K, Sims P, Hyde JE. 2005. Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part II): activities as yet untargeted or specific to Plasmodium. *Trends Parasitol* 2005;**21**:334–9.
28 **Rosenblatt DS**, Fenton W. 2001. *Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 3897–933.
29 **Wang SJ**, Lengeler C, Smith TA, Vounatsou P, Akogbeto M, Tanner M. Rapid Urban Malaria Appraisal (RUMA) IV: epidemiology of urban malaria in Cotonou (Benin). *Malaria* 2006;**5**:45–54.
30 **Zhou SS**, Tang LH, Sheng HF, Wang Y. Malaria situation in the People's Republic of China. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2004;**24**:1–3.

3. Déterminants nutritionnels et génétiques du métabolime des monocarbones : association avec l'hépatite virale B en Afrique de l'Ouest (Publication E)

3.1. Résultats

Caractéristiques de la population d'étude

Quatre cent cinquane cinq volontaires (263 mâles et 192 femelles) ont été recrutés. L'âge moyen était de 26.9 ± 12.8 ans (tranche de 20-60 ans). Trois cent cinquante cinq sujets (67 %) ont été recrutés au Bénin et 150 (33 %) au Togo. Beaucoup plus de femmes ont été recrutées au Bénin qu'au Togo (46% contre 33%, respectivement, p=0,007).

Les concentrations en folates, vitamine B12 et homocystéine et les fréquences des différents génotypes de MTHFR, méthionine synthase (MTR) sont présentés dans le Tableau 1 (Publication E). Les valeurs des folates inférieures à 7 nmol/L et t-Hcys > 15 µmol/L (hyperhomocysteinemie modérée) (Amouzou et al., 2004) ont été retrouvées dans respectivement 27.7% et 56.2% de la population. Seulement 3.2% avaient une vitamine B12 inférieure à 150 pmol/L (Amouzou et al., 2004; Rosenblatt et al., 1999). Le niveau d'homocystéine était 1.8-fois plus élevé chez les porteurs de l'allèle *677 T*, comparés aux sujets porteurs du génotype sauvage 677 CC, avec des valeurs respectives de 15.9 et 28.7 µmol/L (p< 0.0001).

Trois cent cinquante cinq volontaires (78%) étaient positifs pour les anticorps anti-HBc. Il n'y avait aucune différence statistiquement significative entre les sujets positifs anti-HBc et les sujets négatifs anti-HBc (p=0,272) (Tableau 1).

Sujets Anti-HBc positifs

Parmi les 355 volontaires positifs pour anti-HBc, 202 (56.9 %) étaient anti-HBs positifs et 58 (16.3 %) étaient positifs l'Ag HBs. D'autre part, 96 sujets étaient positifs pour les anticorps anti-HBc (27 %) négatifs pour Ag HBs et anticorps anti-HBs (Publication E, Tableau 2).

Au vu de ces résultats, nous avons exécuté plusieurs analyses pour déterminer l'influence des facteurs de la survenue de l'infection de HBV. Dans la première analyse, les sujets négatifs pour HBV ont été considérés en tant qu'ayant l'infection passagère comme les sujets positifs en anticorps anti-HBs. D'autre part, les sujets positifs en anticorps anti-HBc pour l'HBV ont été considérés en tant qu'ayant l'infection persistante comme les sujets positifs en HBsAg. Une analyse univariée a comparé le groupe à l'infection passagère avec le groupe avec l'infection persistante selon la distribution du genre, d'origine géographique, des polymorphismes de MTHFR et de MTR, des allèles de HLA-DRB1, de l'âge, de la vitamine B12, des folates et de la concentration plasmatique en homocystéine (Tableau 2). La présence de l'allèle T à la position 677 du gène de MTHFR a été trouvée dans 33 des 164 sujets (de 20 %) avec l'infection passagère et dans 4 de 55 sujets avec l'infection persistante (7 %) ($p = 0.036$). D'autre part, l'allèle de HLA-DRB1*08 a été trouvé dans 39 % des sujets avec l'infection persistante et dans 18 % des sujets avec l'infection transitoire ($p = 0.02$). Une analyse de régression logistique multivariée a été ensuite réalisée, comprenant les facteurs avec un niveau de $p \leq 0.1$ dans l'analyse univariée (polymorphisme de MTHFR C677T et HLA-DRB1*08, 1301, 1302 allèles) et les facteurs corrélés avec l'infection de HBV (sexe, âge, allèles HLA-DRB1*07, 09, 1301 et 1302). La présence de l'allèle T a été indépendamment associée à une infection transitoire de HBV et de la présence d'anticorps anti-HBs ($p=0.029$) tandis que la présence de HLA-DRB1*08 a été associée à la persistance de l'infection HBV (Tableau 2). En raison de la difficulté pour interpréter la signification du niveau bas d'ADN HBV détectée dans le sang par PCR en excluant en particulier le groupe

d’anti-HBc dans une deuxième analyse. Nous avons comparé les individus anti-HBs positifs aux individus antigène HBs positifs. Dans l'analyse univariée, le genre féminin, l'origine Beninoise, la présence de l’allèle T ont été significativement associés à la présence d’anti-HBs (Tableau 3). Il n'y avait aucune différence statistiquement significative entre les deux groupes quand les distributions des allèles HLA-DRB1 ont été considérées (Tableau 3). Le genre, l'âge, l'origine géographique, le polymorphisme de MTHFR C677T, les distributions de Hla- DRB1*07, 09, 1301 et 1302 ont été analysés comme prédicteurs de séroconversion anti-HBs dans une analyse de régression logistique. Après régression logistique pas à pas, la présence d'un allèle de T a été indépendamment associée à la présence d’anticorps anti-HBs (p=0.029) tandis que l'origine Togolaise a été associée à la persistance de l'infection HBV (p<0.0001). Il faut noter qu’il y avait plus d’hommes parmi les volontaires Togolais (73 contre 51 %, p = 0.01). Ceci peut en partie expliquer la différence entre Togolais et Béninois dans les résultats.

Les 2 sujets avec une mutation 677TT du gène de MTHFR qui étaient positifs pour l'antigène HBs n'ont eu aucun ADN HBV détectable dans le sang tandis que le niveau moyen d'ADN HBV était de 2800000 copies/ml dans les sujets ayant le génotype CC (p = 0.023).

Parmi les 113 sujets anti-HBs positifs, le niveau moyen d'anticorps anti-HBs était de 240 UI/ml dans les sujets 677T et de 150 UI/ml dans le sujet sans la mutation. Par conséquent, nous avons exécuté une troisième analyse dans laquelle les sujets anti-HBs positifs ont été comparés à tous les autres sujets qui étaient anti-HBs positifs et anti-HBc négatifs. Le but de cette analyse était de déterminer les facteurs liés à une immuno-conversion humorale dans l’infection persistante HBV. Dans l'analyse univariée, le sexe féminin, l'origine béninoise, la présence de l’allèle T, la présence d'une mutation homozygote 2756GG du gène MTR, la présence de HLA-DRB1*09 et l'absence de HLA-DRB1*08 ont été significativement associés à la présence d’anti-HBs (Tableau 4). Après régression logistique pas à pas, la présence d'un

allèle 677T du gène de MTHFR, l'origine béninoise, la mutation homozygote GG de MTR et l'allèle de HLA-DRB1*09 ont été indépendamment associés à la présence des anticorps d'anti-HBs.

3.2. Discussion

Notre étude confirme la forte prévalence des marqueurs sérologiques de HBV chez les jeunes adultes africains (Ayoola et al., 1988 ; Thursz et al., 1995). Ainsi 72 % de la population d'étude étaient positifs pour les anticorps d'anti-HBc. Parmi eux, 57 % ont guéri de l'infection de HBV (positif d'anti-HBs), 16 % ont été chroniquement infectés (positifs pour l'antigène HBs). Il était plus difficile de classer 27 % parce qu'ils étaient seulement positifs pour des anticorps anti-HBc. Ces derniers ont été considérés, dans d'autres études, comme ayant récupéré de l'infection de HBV (Thursz et al., 1995 ; Lok et al., 2001) mais ce n'est probablement pas le cas, puisque 25 % de ces sujets étaient positifs pour l'ADN HBV dans notre étude. Nos données confirment l'hétérogénéité extrême du groupe "HBc seul" (Grob et al., 2000). Par conséquent nous avons exécuté plusieurs analyses dans lesquelles les définitions de l'infection passagère et persistante étaient variables. Dans la première analyse, les "HBc-seuls" ont été analysés selon les résultats de quantification HBV par PCR ; si l'ADN de HBV était indétectable, ils étaient classés dans le groupe "infection passagère" comme les sujets positifs pour anti-HBs et si l'ADN de HBV était discernable, ils ont été classés dans le groupe "infection persistante" comme les sujets positifs pour l'antigène HBs. Cette classification est également sujette à la limite en raison de la difficulté pour interpréter la signification des niveaux bas d'ADN HBV détectés avec la technique très sensible de PCR. Pour surmonter cette limite, dans la deuxième analyse, nous avons seulement comparé les sujets positifs pour anti-HBs aux sujets positifs pour l'Ag HBs. Cette comparaison est

probablement la plus appropriée mais le petit nombre de sujets positifs d'antigène de HBs (n = 38) pourrait exposer à une perte de puissance statistique. La troisième analyse a comparé les sujets positifs pour l'anti-HBs à tous les sujets anti-HBs négatifs et positifs pour anti-HBc. La dernière analyse a été faite afin de déterminer les facteurs liés à la persistance d'une immuno-réaction humorale à long terme.

Plusieurs caractéristiques des patients se sont avérées des facteurs prédictifs indépendants dans les différentes analyses. Ainsi, l'origine béninoise a été indépendamment associée à l'évolution favorable dans 2 des 3 analyses. Nous n'avons aucune explication claire, mais il y avait sensiblement plus de femmes parmi les Béninois et les études précédentes ont prouvé que le genre féminin était un facteur prédictif indépendant de l'évolution favorable de l'infection HBV (Coursaget et al., 1987 ; Lok et al., 2001). Dans notre étude, un lien entre le genre féminin et l'évolution favorable a pu être trouvé seulement dans l'analyse univariée. La haute fréquence de l'infection chronique de HBV au Togo pourrait être expliquée par le fait que des scarifications traditionnelles sont probablement plus répandues chez les enfants très en bas âge dans ce pays. Les études précédentes ont prouvé que le risque d'infection persistante à HBV chez les enfants est inversement proportionnel à l'âge de la contamination (Thursz et al., 1995 ; Coursaget et al., 1987).

Les gènes HLA jouent un rôle critique dans l'immunoréactivité à l'infection virale. C'est pourquoi la majorité des études génétiques se sont concentrés sur des associations HLA. Les résultats de ces études suggèrent que les antigènes de la classe II et en particulier les allèles de DR produisent une immuno-réaction efficace contre l'HBV (Thursz et al., 1995 ; Almarri et al., 1994 ; Höhler et al., 1997 ; Thio et al., 1999 ; Ahn et al., 2000). Cependant l'allèle spécifique varie selon les études (Thio et al., 2000). Dans notre population, HLA-DRB1*08 a été indépendamment associé à l'infection persistante dans l'analyse dans laquelle les sujets HBc positifs ont été classifiés selon les résultats de l'ADN HBV. A notre connaissance, cette

association n'a été déja jamais décrite. D'autre part, la présence de l'allèle DRB1*09 a semblé être associée à la persistance des anticorps anti-HBs. C'est en opposition aux résultats d'une étude réalisée en Corée dans laquelle HLA-DR*09 était sensiblement plus fréquent chez les patients positifs AgHBs comparés aux sujets positifs pour l'anti-HBs (Ahn et al., 2000). Contrairement aux études précédentes (Thursz et al., 1995 ;Höhler et al., 1997), nous n'avons pas trouvé une association indépendante entre HLA-DRB1*1302 et les résultats de l'infection de HBV. Même lorsque les sujets HBc positifs seuls ont été considérés comme ayant une infection passagère, HLA-DRB1*1302 n'a pas été sensiblement associé aux résultats favorables. En raison de l'hétérogénéité du statut HBc, les conclusions les plus plausibles sont probablement données par les études dans lesquelles les patients anti-HBc seuls ont été exclus de l'analyse (Almarri et al., 1994 ; Höhler et al., 1997 ; Thio et al., 1999 ; Ahn et al., 2000). Nous n'avons trouvé aucune association significative entre les antigènes HLA et l'infection de HBV dans ce type d'analyse, peut être en raison du petit nombre de sujets AgHBs positifs.

Le point le plus étonnant de notre étude était la découverte d'un lien entre la présence d'un allèle T à la position 677 du gène de MTHFR et l'évolution favorable de l'infection de HBV quelque soit le type d'analyse faite. Comme rapporté dans d'autres études réalisées sur les Afro-Africains et les Afro-Américains (Rajkovic et al., 2000 ; Botto et al., 2000), le génotype TT était extrêmement rare (1 %) et la prédominance du génotype CT était seulement de 18 %. Par conséquent, les génotypes TT et CT ont été analysés ensemble et comparés au génotype CC. Le polymorphisme MTHFR C677T influence le statut de méthylation d'ADN par une interaction avec le statut en folates (Friso et al., 2002). Une fonction largement attribuée à la méthylation d'ADN est celle d'un mécanisme de défense du génome contre les « envahisseurs étrangers » tels que les éléments transposables et l'ADN proviral. La méthylation de l'ADN des rétrovirus intégrés dans le génome peut mener à l'inactivation virale (Jahner et al., 1982). Par conséquent nous avons postulé qu'en cas d'infection chronique, la méthylation de l'ADN

de HBV peut influencer les résultats de l'infection. Les sujets avec les génotypes TT et CT auront plus fréquemment le statut hypométhylation d'ADN de HBV et par conséquent des niveaux plus élevés de réplication de HBV en cas d'infection chronique. Nos résultats n'ont pas confirmé cette hypothèse mais suggèrent que ces génotypes peuvent favoriser le dégagement de HBV. Alternativement, il a été montré que la méthylation de l'ADN proviral du virus d'Epstein Barr, qui maintient la capacité d'être réactivé, permet au virus de survivre en échappant à la surveillance immunitaire (Robertson et al., 1997). Ainsi, l' hyperméthylation de l'ADN de HBV, qui est théoriquement plus élevée chez les sujets CC que dans les génotypes de TT et de CT, pourrait favoriser la persistance de l'infection. Les analyses éventuelles des niveaux viraux et des immuno-réactions des chimpanzés avec l'hépatite aiguë B prouvent que l'élimination de HBV est le résultat de l'immunité innée aussi bien que de l'immunité spécifique (Guidotti et al., 1999 ; Kakimi et al., 2000). L'évolution de l'hépatite chronique semble être provoquée par un échec des immuno-réactions exacerbées aux antigènes de HBV (Chisari et al., 1995). L'impact du polymorphisme MTHFR C677T sur des fonctions immunisées est inconnu. On a signalé que la carence en folates peut altérer la réponse immune, y compris l'immunité humorale (Dhur et al., 1991 ; Gross et al., 1975). D'autre part, l'intégrité et la stabilité de l'ADN, qui dépend du statut en folates et de la méthylation d'ADN, peuvent influencer l'infection virale. Nous avons observé une prévalence de carence en folates dans la population entière, en même temps qu'une augmentation de 1.8 fois de l'homocystéine des porteurs d'allèle 677T. Dans ces conditions, l'insuffisance conduit à une disponibilité cellulaire diminuée du 5-10-methylene-tetrahydrofolate qui est essentiel pour la conversion du deoxyruridilate en thymidilate. Toutefois le déséquilibre entre 5-10-méthylène-tetrahydrofolate et méthyl-tetrahydrofolate est plus limité dans des porteurs de l'allèle *677T* que dans les sujets ayant un génotype sauvage, en raison de la diminution de catalyse du 5-10-méthylène-tétrahydrofolate. L'uracile est anormalement incorporé à l'ADN

si la méthylation du deoxyuridylate en thymidilate est insuffisante (Blount et al., 1997). L'uracile incorporé est excisé et ceci peut produire des coupures simple-brin (Dianov et al., 1991) menant à l'instabilité et à la fragilisation des chromosomes. Actuellement, il est possible que l'effet favorable du polymorphisme de MTHFR C677T sur la disponibilité cellulaire de thymidilate puisse réduire les coupures dans les chromosomes et l'intégration d'ADN d'HBV dans le génome humain. L'intégration d'ADN de l'HBV peut se produire pendant la phase aigüe de l'hépatite mais le rôle de cet événement dans les suites de l'infection est inconnue (Bréchot et al., 1981 ; Yoffe et al., 1990). Cependant, l'association d'une immunité humorale persistante avec le polymorphisme de MTR semble confirmer un lien entre le statut de méthylation de l'ADN et l'immuno-conversion HBV.

Les causes infectieuses environnementales peuvent conférer un avantage sélectif ou exercer une pression sélective sur la fréquence de l'allèle T de MTHFR, en vue des différences dramatiques observées en Afrique, dans les populations Afro-Américaines et en Chine (Guéant et al., 2007). La basse fréquence de l'allèle 677T dans les pays d'Afrique de l'ouest pourrait laisser supposer que l'infection de HBV exerce une pression sélective sur la fréquence de l'allèle 677T (Lee et al., 1997 ; Ayoola et al., 1988 Thrusz et al., 1995). Nos données suggèrent que cette hypothèse est peu probable, au regard de l'association de 677T avec l'infection transitoire d'HBV et la persistance des anticorps anti-HBs.

En conclusion, notre étude a démontré de manière originale une association entre le polymorphisme de MTHFR et HBV chez les adultes africains. Ces résultats devraient être confirmés dans d'autres groupes ethniques mais également pendant l'infection aiguë de HBV et suggèrent d'évaluer les mécanismes d'interaction entre le polymorphisme MTHFR, la vitamine B12 et les folates et l'infection.

Publication E

ELSEVIER

Journal of Hepatology 48 (2008) 532–539

Journal of Hepatology

www.elsevier.com/locate/jhep

Methylenetetrahydrofolate reductase 677 T allele protects against persistent HBV infection in West Africa ☆,☆☆

Jean-Pierre Bronowicki[1,2,*], Idrissia Abdelmouttaleb[1,2], Laurent Peyrin-Biroulet[1,2], Véronique Venard[3], Hacène Khiri[4], Nicodème Chabi[5], Emile K. Amouzou[6], Hélène Barraud[1,2], Philippe Halfon[4], Ambaliou Sanni[5], Marc-André Bigard[1,2], Alain Le Faou[3], Jean-Louis Guéant[1,2]

[1]*Inserm U724, Cellular and Molecular Pathology in Nutrition, Faculté de Médecine, University Henri Poincaré of Nancy, Vandoeuvre lès Nancy, France*
[2]*Service d'hépato-gastroentérologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, France*
[3]*Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, France*
[4]*Laboratoire Alphabio, Marseille, France*
[5]*Laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, Cotonou, Benin*
[6]*Laboratoire de biochimie et nutrition, Lomé, Togo*

***Background/Aims*: Homocysteine metabolism is linked to DNA methylation, a mechanism potentially involved in the course of hepatitis B virus (HBV) infection. We evaluated the association of determinants of homocysteine metabolism with the outcome of HBV infection.**

***Methods*: Four hundred and fifty-five healthy adults from Togo and Benin were tested for HBV serologic markers, HLA DR alleles, folate, vitamin B12, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C→T, 1298 A→C and methionine synthase 2756 A→G polymorphisms.**

***Results*: Seventy-eight percent of the study population was anti-HBc positive. Among them, 202 (56.9%) were anti-HBs positive and 58 (16.3%) were HBsAg positive. After stepwise logistic regression, the MTHFR *677 T* allele was independently associated with persistence of detectable anti-HBs antibodies (OR: 2.47; 95% CI: 1.29–4.71; $p = 0.006$). The mean HBV DNA level was significantly lower in HBsAg positive subjects carrying the 677 T allele than in those with the 677 CC genotype (1000 ± 1406 vs. 2,400,000 ± 214,000 copies/ml, $p = 0.005$). Beninese origin and HLA-DRB1*09 allele were the other determinants independently associated with favorable outcome of HBV infection.**

***Conclusions*: The methylenetetrahydrofolate reductase 677 T allele seems to protect against chronic HBV infection in young African adults.**

© 2008 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

***Keywords*: Hepatitis B virus; Gene polymorphism; Methylenetetrahydrofolate reductase; Methionine synthase; Homocysteine; Folate; Vitamin B12; HLA-DRB1**

1. Introduction

Chronic hepatitis B infection is a major health problem, with approximately 350 million virus carriers worldwide [1]. In Africa, about 30–60% of children and 60–100% of adults have been infected with the hepatitis B virus (HBV) [2,3]. In some cases the virus is not cleared and persistent HBV infection predisposes patients to chronic liver disease and hepatocellular carcinoma [1].

Received 25 April 2007; received in revised form 6 October 2007; accepted 8 November 2007; available online 2 January 2008
Associate Editor: R.P. Perrillo

☆ This study was partially supported by the "Association Lorraine des Hépatites".

☆☆ The authors declare that they do not have anything to disclose regarding conflict of interest with respect to this manuscript.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 15 33 54; fax: +33 3 83 15 36 33.
E-mail address: jp.bronowicki@chu-nancy.fr (J.-P. Bronowicki).

0168-8278/$34.00 © 2008 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jhep.2007.11.017

Since the development of chronic hepatitis B may be dependent on host factors, it is more common in children – especially newborns – than in adults, in men than in women, and in immunosuppressed individuals than in immunocompetent subjects [4,5]. Several studies have tried to find a link between genetic polymorphisms and the outcome of HBV infection. Human leukocyte antigen (HLA) [3,6–9], tumor necrosis factor α [10], mannose binding protein [11–13] and the vitamin D receptor [14] have been examined as potential genes that may play a role in HBV pathogenesis. So far, the only reproducible association between host genetics and HBV infection involves HLA class II alleles and particularly the DR alleles [15]. Nutrigenetic interactions between folate and vitamin B12 status and one-carbon metabolism may influence the outcome of HBV infection, particularly via viral inactivation by DNA methylation [16]. The synthesis of *S*-adenosylmethionine, the DNA methyl donor, is dependent on homocysteine and folate metabolism. In mammalian cells, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a folate metabolizing enzyme that converts 5–10 methylenetetrahydrofolate to 5-methyl-tetrahydrofolate. Methionine synthase (MTR) catalyzes the synthesis of methionine, the precursor of *S*-adenosylmethionine. Alterations in folate metabolism may result in deficient DNA methylation and depletion in nucleotide precursors necessary for *de novo* DNA synthesis [16,17] (Fig. 1). The 677 C→T polymorphism of MTHFR gene decreases 4-fold the catalytic rate of the enzyme, leading to moderate hyperhomocysteinemia when associated with low plasma folates [18,19]. The second polymorphism of the MTHFR gene, 1298 A→C, also leads to reduced enzyme activity in 677 T allele carriers [20]. In addition, a 2756 A→G polymorphism in the MTR gene seems to be associated with homocysteine [21].

The aim of our study was to assess the interaction between the nutritional (vitamin B12 and folate) and genetic determinants (polymorphisms of MTHFR and MTR) of homocysteine and replication and the outcome of hepatitis B in 455 young African adults from two West African countries, Togo and Benin.

2. Methods

2.1. Study population

The study subjects were healthy African adults recruited in Cotonou (Benin) and in Lomé (Togo) after their informed consent was obtained. The Local Ethics Committee approved the study protocol. Fasting venous blood was collected in EDTA-containing tubes. Aliquots were immediately centrifuged and plasma was stored at −30 °C until analysis. Genomic DNA was isolated from blood buffy coat using the Qiagen kit, according to the manufacturer's recommendations (Qiagen-France, Courtaboeuf, France) and stored at −30 °C for genetic analyses.

2.2. Determination of plasma folate, vitamin B12 and homocysteine

Plasma vitamin B12 and folate concentrations were assayed by the immunoassay kit "VB12 and folates" on an ACS 180 automated chemiluminescent system (Chiron Diagnostics Corporation, East Walpole, MA, USA). Plasma total homocysteine (t-Hcys) concentrations were determined by Abbott Fluorescence Polarization Immunoassay technology (Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park-IL, USA).

2.3. MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and HLA-DRB1 genotyping

The genotyping procedures to detect MTHFR C677T, MTHFR A1298C and MTR A2756G have been previously described and used HinfI, Fnu4HI and HaeIII enzymes, respectively, for restriction sites [18,20,21]. HLA-DRB1 DNA typing was performed in subjects who tested positive for HBV serologic markers. It was performed by means of hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes, after amplification of the second exon of the DRB1 gene using the InnoLipa HLA genotyping test (Abbott, France and Innogenetics, Ghent, Belgium). Only 182 subjects could be tested for HLA-DRB1.

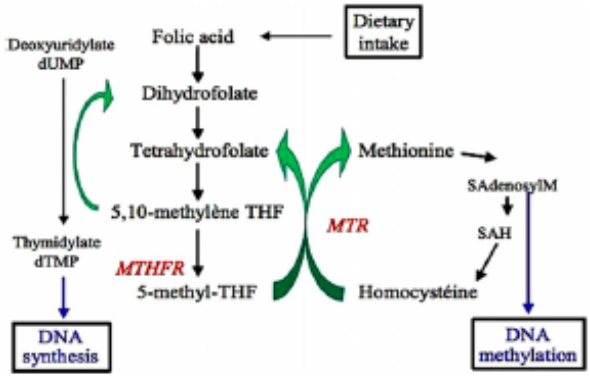


Fig. 1. One-carbon metabolism pathways of DNA synthesis and methylation. *Abbreviations:* MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; MTR, methionine synthase; THF, tetrahydrofolate. [This figure appears in colour on the web.]

2.4. HBV serologic testing and HBV-DNA quantification

The blood of each volunteer was tested for IgG antibodies against the HBV core antigen (anti-HBc). All anti-HBc positive subjects were tested for HBV surface antigen (HBsAg) and for the antibody to HBV surface antigen (anti-HBs). Serological testing for HBsAg, anti-HBs and anti-HBc antibodies was carried out by using commercial enzyme immunoassays according to manufacturer's instructions (AXSYM HBs Ag V2, AXSYM AUSAB®, AXSYM core™, Abbott Laboratories, Rungis, France). For each anti-HBc positive anti-HBs negative subject, a quantitative HBV PCR was carried out using the Cobas amplicor HBV Monitor™ test according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Meylan, France). The sensitivity threshold of this technique is 200 copies/ml. Individuals with "anti-HBc alone" were divided into three major categories according to HBV infection stage [22,23].

2.5. Statistical analysis

The χ^2 or Fisher's exact tests were used to compare discrete variables and alleles between the two groups considered, while Wilcoxon's rank sum test was used for continuous variables. The level of significance was set at 0.05. The minimal size of our population sample was estimated at 100 patients with a study power $1-\beta=0.8$ and $\alpha=0.05$, assuming a 1.5-fold difference in the less frequent alleles between controls and patients. A multivariate logistic regression model was used to determine which variables predicted the outcome of HBV infection. Any factors usually known to be correlated with the outcome of HBV infection, i.e. gender, age, HLA-DRB1*07, 09, 1301 and 1302 alleles [3,6–9,15] or with a p level $\leqslant 0.1$ in the univariate analysis, were subsequently tested in the logistic regression model (stepwise selection). Continuous variables were entered into the model as covariables. Adjusted odds ratio (OR) and 95% confidence interval were derived from the coefficient of the final multivariate logistic model. Statistical analysis was performed using SPSS software (SPSS 10.1).

3. Results

3.1. Characteristics of the study population

Four hundred and fifty-five volunteers (263 males and 192 females) were recruited. The mean age was 26.9 ± 12.8 years (range: 20–60 years) with no difference between males and females (26.8 ± 12.3 vs. 27.0 ± 13.5, respectively, $p=0.922$). Three hundred and five subjects (67%) lived in Benin and 150 (33%) resided in Togo. Geographical origin, mean blood folate level, vitamin B12 and homocysteine and frequencies of the different MTHFR and MTR genotypes are presented in Table 1. More females were recruited in Benin than in Togo (46% vs. 33%, respectively, $p=0.007$).

Plasma folate was lower than 7 nmol/L (threshold for deficient status) and plasma t-Hcys exceeded the 15 μmol/L threshold value of moderate hyperhomocysteinemia [19] in 27.7% and 56.2% of the whole population, respectively, while only 3.2% had a vitamin B12 level lower than the 150 pmol/L threshold value defined for vitamin B12 deficiency [19,24]. Homocysteine levels were lower in females than in males (15.8 vs. 21.8 μmol/L, $p<0.001$), while folate and vitamin B12 were higher (13.7 ± 12.9 vs. 9.3 ± 5.0 nmol/L, $p<0.001$ and 621 ± 227 vs. 463 ± 255 pmol/L, $p=0.003$, respectively). Homocysteine levels were 1.8-fold higher in allele *677 T* carriers, compared to subjects with the 677 CC wild genotype, with respective values of 15.9 and 28.7 μmol/L ($p<0.001$), while vitamin B12 and folate levels were not statistically different. Gender did not influence genotype distribution. In particular, the allele T of MTHFR C677T was reported in 18.2% and 18.3% of females and males, respectively ($p=0.995$).

Three hundred and fifty-five (78%) volunteers tested positive for HBc antibodies, with no gender difference ($p=0.272$). The frequency of the CT + TT genotypes of MTHFR C677T was slightly higher in the anti-HBc negative subjects. There were no statistically significant differences in other biological and genetic characteristics

Table 1
Demographic characteristics, mean blood folate, vitamin B12 and homocysteine levels and frequencies of the different genotypes of methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase (MTR) in the general study population and according to the status of the HBV core antibody (anti-HBc)

	All subjects $n=455$	Anti-HBc negative subjects $n=100$	Anti-HBc positive subjects $n=355$	p^a
Age (years)	26.9 ± 12.8	27.2 ± 13.5	26.8 ± 12.6	ns
Male (%)	263 (57.8)	53 (55.0)	210 (59.2)	ns
Origin:				
Benin (%)	305 (67.0)	75 (75)	230 (64.8)	
Togo (%)	150 (33.0)	25 (25)	125 (35.2)	ns
Folate (nmol/L)	10.85 ± 9.14	10.25 ± 8.63	10.97 ± 9.22	ns
Vitamin B12 (pmol/L)	556 ± 441	615 ± 502	532 ± 404	ns
Homocysteine (μmol/L)	17.81 ± 14.7	18.10 ± 20.3	17.55 ± 14.52	ns
MTHFR C677T				
CC (%)	372 (81.8)	77 (77.0)	295 (83.1)	
CT + TT (%)	83 (18.2)	23 (23.0)	60 (16.9)	0.043
MTHFR A1298C				
AA (%)	318 (70.0)	76 (76.0)	242 (68.2)	
AC + CC (%)	137 (30.0)	24 (24.0)	113 (31.8)	ns
MTR A2756G				
AA (%)	253 (55.6)	60 (60.0)	193 (54.4)	
AG + GG (%)	202 (44.4)	40 (40.0)	162 (45.6)	ns

[a] Comparison of anti-HBc negative vs. anti-HBc positive subjects.

between anti-HBc positive and anti-HBc negative subjects (Table 1).

3.2. Anti-HBc positive subjects

Among the 355 anti-HBc positive volunteers, 202 (56.9%) were anti-HBs positive and 58 (16.3%) were HBsAg positive while 96 anti-HBc positive subjects (27.0%) tested negative for HBsAg and anti-HBs antibodies.

We performed two analyses to determine the influence of host factors on the outcome of HBV infection. First, we compared the anti-HBs positive individuals to the HBs antigen positive individuals. In univariate analysis, female gender, Beninese origin, and the minor alleles of MTHFR C677T, MTHFR A1298C and MTR A2756G polymorphisms were significantly more frequent in the anti-HBs positive subjects with the presence of anti-HBs (Table 2). There was no significant difference between the two groups when the distributions of HLA-DRB1 alleles were considered (Table 2). Gender, age, geographical origin, MTHFR C677T polymorphism and distributions of HLA-DRB1*07, 09, 1301 and 1302 were analyzed as predictors of anti-HBs seroconversion in a logistic regression analysis. After stepwise logistic regression, the presence of the minor allele of either MTHFR C677T or MTR A2756G polymorphisms was independently associated with the presence of anti-HBs antibodies, whereas Togolese origin was associated with the persistence of HBV infection (Table 2). Gender was not considered as a significant determinant in the multivariate analysis and it had no influence on these associations when the analysis was stratified on it. However, this first analysis was limited by the inadequate size of the HBs positive antigen group.

We therefore performed a second analysis in which the anti-HBs positive subjects were compared with all

Table 2
Comparison between HBs antigen positive and anti-HBs positive subjects

	Univariate analysis			Logistic regression analysis		
	HBsAg + subjects $n = 58$ (22.3%)	Anti-HBs + subjects $n = 202$ (77.7%)	p	OR	(95% CI)	p
Sex – M/F	40/18	110/92	0.051			
Age (year)	24.9 ± 10.0	26.1 ± 13.4	ns			
Origin						
Togo	34 (58.6)	53 (26.2)		0.24	(0.13–0.45)	<0.0001
Benin	24 (41.4)	149 (73.8)	<0.0001	1		
Vitamin B12 (pmol/l)	584 ± 352	507 ± 390	ns			
Folate (nmol/l)	11.0 ± 17.1	10.6 ± 8.4	ns			
Homocysteine (μmol/L)	16.2 ± 12.0	18.1 ± 15.3	ns			
MTHFR C677T						
CC	53 (91.4)	158 (78.2)		1		
CT + TT	5 (8.6)	44 (21.7)	0.023	2.89	(1.06–7.9)	0.037
MTHFR A1298C						
AA	46 (79.3)	130 (64.4)				
AC + CC	12 (20.7)	72 (35.6)	0.038			
MTR A2756G						
AA	39 (67.2)	101 (50.0)		1		
AG + GG	19 (32.8)	101 (50.0)	0.025	2.18	(1.15–4.15)	0.017
DR B1[a]						
01	3 (8)	10 (12)	ns			
03	15 (40)	22 (26)	ns			
04	3 (8)	1 (1)	0.085			
07	5 (13)	12 (14)	ns			
08	10 (26)	15 (17)	ns			
09	2 (5)	15 (17)	0.091			
10	2 (5)	4 (5)	ns			
11	10 (26)	19 (22)	ns			
12	1 (3)	5 (6)	ns			
13	15 (39)	35 (41)	ns			
1301	6 (16)	22 (26)	ns			
1302	6 (16)	22 (26)	ns			
14	1 (3)	3 (4)	ns			
15	8 (21)	26 (30)	ns			
16	0	2 (2)	ns			

The 95 subjects with "anti-HBc alone" were excluded from this analysis. Gender, age, geographical origin and either MTHFR C677T or MTR A2756G polymorphisms were retained as predictors of anti-HBs seroconversion in the logistic regression analysis.

[a] HLA-DRB1 could be determined in 124 of the subjects included in this analysis.

the other subjects who were anti-HBc positive anti-HBs negative. The aim was to determine the factors linked to a persistent detectable humoral immune response to HBV infection. The sample size of the two groups was consistent with the estimated size for a study power $1-\beta=0.8$ and $\alpha=0.05$. In univariate analysis, female gender, geographical origin, the presence of a T allele at position 677 of the MTHFR gene, the presence of HLA-DRB1*09 and the absence of HLA-DRB1*08 were significantly associated with the presence of anti-HBs (Table 3). After stepwise logistic regression, the presence of a T allele at position 677 of the MTHFR gene, geographical origin and the HLA-DRB1*09 allele were independently associated with the presence of anti-HBs antibodies.

The mean HBV DNA level in HBsAg positive subjects with the 677 T allele of the MTHFR gene was significantly lower than in those with the 677 CC genotype (1000 ± 1406 copies/ml vs. 2,400,000 ± 214,000 copies/ml, $p=0.005$). On the other hand, HBV DNA levels did not seem to be influenced by MTR genotype.

In addition, the 2 subjects with a mutation at position 677 of the MTHFR gene who were HBs antigen-positive had no detectable blood HBV DNA, whereas the mean HBV DNA level was 2,800,000 copies/ml in subjects with the CC genotype ($p=0.023$).

4. Discussion

In this study 78% of the population was positive for anti-HBc antibodies, thus confirming the high prevalence of HBV serologic markers in young African adults [2,3]. Among them, 57% recovered from HBV infection (anti-HBs positive), 16% were chronically infected (HBs antigen positive) and 27% were more difficult to classify because they were only positive for anti-HBc antibodies. Our data confirm the extreme heterogeneity of the "HBc

Table 3
Comparison between anti-HBs positive and anti-HBs negative subjects

	Univariate analysis			Logistic regression analysis		
	Anti-HBs − subjects $n=153$ (43.1%)	Anti-HBs + subjects $n=202$ (46.9%)	p	OR	(95% CI)	p
Sex – M/F	100/53	110/92	0.013			
Age (year)	27.8 ± 11.5	26.1 ± 13.4	ns			
Origin						
Togo	72 (47.1)	53 (26.2)		0.43	(0.27–0.68)	0.0003
Benin	81 (52.9)	149 (73.8)	<0.0001	1		
Vitamin B12 (pmol/l)	573 ± 325	507 ± 390	ns			
Folate (nmol/l)	11.2 ± 16.9	10.6 ± 8.4	ns			
Homocysteine (μmol/L)	17.2 ± 15.0	18.1 ± 15.3	ns			
MTHFR C677T						
CC	137 (89.6)	158 (78.2)		1		
CT + TT	16 (10.5)	44 (21.8)	0.006	2.47	(1.29–4.71)	0.006
MTHFR A1298C						
AA	112 (73.2)	130 (64.3)				
AC + CC	41 (26.8)	72 (35.7)	ns			
MTR A2756G						
AA	92 (60.1)	101 (50.0)				
AG + GG	61 (39.9)	101 (50.0)	0.067			
DRB1[a]						
01	6 (6)	10 (12)	ns			
03	38 (40)	22 (26)	0.058			
04	7 (7)	1 (1)	0.068			
07	13 (13)	12 (14)	ns			
08	28 (29)	15 (17)	0.08			
09	5 (5)	15 (17)	0.009	0.278	(0.093–0.835)	0.023
10	4 (4)	4 (5)	ns			
11	25 (26)	19 (22)	ns			
12	1 (1)	5 (6)	ns			
13	42 (44)	35 (41)	ns			
1301	21 (22)	22 (26)	ns			
1302	21 (22)	22 (26)	ns			
14	1 (1)	3 (4)	ns			
15	22 (23)	26 (30)	ns			
16	1 (1)	2 (2)	ns			

Gender, age, geographical origin, MTHFR C677T and MTR A2756G polymorphisms, and the distributions of HLA-DRB1*03, 04, 07, 08, 09, 1301 and 1302 were analyzed as predictors of anti-HBs seroconversion in a multivariate logistic regression analysis.
[a] HLA-DRB1 could be determined in 182 of the subjects included in this analysis.

alone'' group [22]. Therefore we performed two analyses. First, we compared only anti-HBs positive and HBsAg positive subjects. Second, we compared the anti-HBs positive subjects to all the anti-HBc positive and anti-HBs negative subjects, in order to determine the factors linked to the persistence of a long-term humoral immune response.

Beninese origin was independently associated with a favorable outcome in both analyses, a finding for which we have no clear explanation. There were significantly more females among Beninese subjects and previous studies have shown that female gender is an independent predictive factor of favorable outcome in HBV infection [4,5]. In our study, a link between female gender and favorable outcome was only found in univariate analyses. In the multivariate analysis, it was not considered as an independent determinant.

The high frequency of chronic HBV infection in Togo might be due to the fact that the traditional practice of scarification is probably more prevalent in very young children in this country. Previous studies have shown that the risk of persistent HBV infection in children is inversely proportional to the age of contamination [3,4].

Our study evidenced an association between the presence of a T allele at position 677 of the MTHFR gene and a favorable outcome of HBV infection, whatever the type of analysis. As reported in other studies performed on black Africans and Afro-Americans [18,19,25,26], the TT genotype was extremely rare (1%) and the prevalence of the CT genotype was only 18%. Therefore, the TT and CT genotypes were analyzed together and compared to the CC genotype. The MTHFR C677T polymorphism influences DNA methylation status through an interaction with folate status [27]. One function widely ascribed to DNA methylation is that of a genome defense mechanism against foreign invaders such as transposable elements and proviral DNA [16]. Alternatively, it has been shown that the methylation of Epstein Barr virus proviral DNA, which retains the ability to be reactivated, allows the virus to survive by escaping immune surveillance [28]. Thus, the hypermethylation of HBV DNA, which is theoretically higher in CC than in TT and CT genotypes, might favor the persistence of infection. Prospective analyses of viral levels and immune responses of chimpanzees with acute hepatitis B show that clearance of HBV is the result of both non-specific and specific immunity [29,30]. Evolution to chronic hepatitis appears to be caused by a failure of prompt and vigorous immune responses to HBV antigens [31]. The impact of MTHFR C677T polymorphism on immune functions is unknown. Folate deficiency may lead to adverse effects on immune functions, including suppressed humoral immunity and impaired cell-mediated cytotoxicity [32,33]. However, we did not find any correlation between blood folate levels and outcome of HBV infection. In fact, the current dosage may not be correlated with the folate level at the time of acute infection, which occurs mostly during childhood in Africa [3].

We already observed a high prevalence of folate deficiency in the population of West Africa [18,19]. Under these conditions, folate deficiency leads to a decreased conversion of deoxyuridilate to thymidilate, DNA misincorporation of uracil and subsequent transient single-strand breaks [34,35] and expression of fragile sites in chromosomes. It was shown that human papillomavirus tends to integrate in fragile sites that may be folate-dependent [36]. The favorable effect of MTHFR C677T polymorphism on thymidilate cellular availability might reduce the fragile sites in chromosomes and therefore HBV DNA integration in the human genome. HBV DNA integration is known to occur during acute hepatitis B but the role of this event in the outcome of infection remains unknown [37,38].

We have already evaluated the influence of the 677 T allele in population studies performed in the same regions of Benin and Togo as in the present study. We found the lowest worldwide frequency of the 677 T allele in these countries and showed that the polymorphism had a dramatic influence on plasma homocysteine levels [18,19]. Similarly, we observed high homocysteine levels and a high frequency of the MTHFR 677 T allele in our study population compared with European populations [18]. Environmental factors might confer a selective advantage or exert a selective pressure on the frequency of the MTHFR 677 T allele, with regard to the dramatic differences observed between African and the Afro-American populations [39]. It could be therefore hypothesized that HBV infection exerts a selective pressure on the 677 T allele frequency, in view of the high prevalence of HBV in these countries [1–3]. Nevertheless, our data suggest that this hypothesis is unlikely, given the association of 677 T with HBV transient infection and the persistence of detectable anti-HBs antibodies.

A large number of population studies worldwide have found an association between HLA-DRB alleles and diseases related with immune disorders, including autoimmunity and IgE production [40,41]. An association has also been found with digestive and liver diseases, including inflammatory bowel diseases and chronic pancreatitis [42,43]. HLA-DRB influences the type of liver injury in drug-induced idiosyncratic liver disease [44] and also seems associated with the response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C and B [45,46]. In our study population, HLA-DRB1*08 was independently associated with persistent infection in the analysis in which the HBc alone subjects were classified according to the results of HBV DNA. On the other hand, the presence of the DRB1*09 allele seemed to be associated with the persistence of anti-HBs antibodies, in contrast to previous results in a Korean study in which HLA-DR9 was significantly more

frequent in HBsAg positive patients compared to anti-HBs positive subjects [9]. We did not find an independent association between HLA-DRB1*1302 and the outcome of HBV infection [3,7]. Even when subjects with HBc alone were considered as having transient infection, HLA-DRB1*1302 was not significantly associated with favorable outcome (16% in HBsAg positive subjects vs. 26% in anti-HBs positive + HBc alone subjects, ns) (data not shown). In view of the heterogeneity of HBc status, the most pertinent conclusions are probably given by the studies in which anti-HBc alone subjects were excluded from the analysis [6–9].

In conclusion, this study is the first to demonstrate an association between MTHFR polymorphism and HBV outcome in African adults. These results now require confirmation in other ethnic populations and during HBV acute infection in order to assess the interaction between MTHFR polymorphism and the outcome of infection.

Acknowledgments

The authors thank Renée Debard and Sylvie Thirion for excellent technical assistance; Sylvia Bronowicki (Faculté de Médecine de Nancy) and Ray Cooke (Université de Bordeaux) for their valuable help in editing the manuscript; and Frederic Eberlé from Roche Diagnostic France for providing kits for the study.

References

[1] Lee WM. Hepatitis B virus infection. N Engl J Med 1997;24:1733–1745.
[2] Ayoola EA. Viral hepatitis in Africa. In: Zuckerman AJ, editor. Viral hepatitis and liver diseases. New York: Liss; 1988. p. 161–169.
[3] Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CEM, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AVS. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. N Engl J Med 1995;332:1065–1069.
[4] Coursaget P, Yvonnet B, Chotard J, Vincelot P, Sarr M, Diouf C, et al. Age- and sex-related study of hepatitis B virus chronic carrier state in infants from an endemic area (Senegal). J Med Virol 1987;22:1–5.
[5] Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop. Gastroenterology 2001;120: 1828–1853.
[6] Almarri A, Batchelor JR. HLA and hepatitis B infection. Lancet 1994;344:1194–1195.
[7] Höhler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, et al. HLA-DRB1*1301 and *1302 protect against chronic hepatitis. J Hepatol 1997;26:503–507.
[8] Thio CL, Carrington M, Marti D, O'Brien SJ, Vlahov D, Nelson KE, et al. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans. J Infect Dis 1999;179: 1004–1006.
[9] Ahn SH, Park JY, Lee CK, Lee CK, Kang SW, Chon CY, et al. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. Hepatology 2000;31:1371–1373.
[10] Höhler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Büschenfelde KH, Rittner C. A tumour necrosis factor-alpha (TNF-α) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. Clin Exp Immunol 1998;111:579–582.
[11] Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW, et al. Mutation of gene for mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. Lancet 1996;348:1417–1419.
[12] Höhler T, Wunschel M, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Büschenfelde KH, Rittner C. No association between mannose-binding lectin alleles and susceptibility to chronic hepatitis B virus infection in German patients. Exp Clin Immunogenet 1998;15:130–133.
[13] Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, Thursz M, Sumiya M, Summerfield J, et al. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. Q J Med 1998;91:13–18.
[14] Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, et al. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. J Infect Dis 1999;179:721–724.
[15] Thio CL, Thomas DL, Carrington M. Chronic viral hepatitis and the human genome. Hepatology 2000;31:819–827.
[16] Jahner D, Stuhlmann H, Steward CL, Harbers K, Löhler J, Simon I, et al. De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. Nature 1982;298:623–628.
[17] Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. Trends Pharmacol Sci 2001;22:195–201.
[18] Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. Am J Clin Nutr 2006;83:701–707.
[19] Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Guéant RM, Feillet F, Villaume C, et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C→T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. Am J Clin Nutr 2004;79:619–624.
[20] Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Mol Genet Metab 1998;64:169–172.
[21] Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, Herbeth B, et al. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. Thromb Haemost 2005;3:510–515.
[22] Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Günther S, et al. Serological pattern "anti-HBc alone: report on a workshop. J Med Virol 2000;62:450–455.
[23] Dickson RC, Everhart JE, Lake JR, Wei Y, Seaberg EC, Wiesner RH, et al. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. Gastroenterology 1997;113: 1668–1674.
[24] Rosenblatt DS, Whitehead VM. Cobalamin and folate deficiency: acquired and hereditary disorders in children. Semin Hematol 1999;36:19–34.
[25] Rajkovic A, Mahomed K, Rozen R, Malinow MR, King IB, Williams MA. Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C→T polymorphism, plasma folate, vitamin B12 concentrations and risk of preeclampsia among black African women from Zimbabwe. Mol Genet Metab 2000;69:33–39.
[26] Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am J Epidemiol 2000;151:862–877.

[27] Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:5606–5611.
[28] Robertson KD, Ambinder RF. Methylation of the Epstein-Barr virus genome in normal lymphocytes. Blood 1997;90:4480–4484.
[29] Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. Science 1999;284:825–829.
[30] Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. J Exp Med 2000;192:921–930.
[31] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu Rev Immunol 1995;13:29–60.
[32] Dhur A, Galan P, Hercberg S. Folate status and the immune system. Prog Food Nutr Sci 1991;15:43–60.
[33] Gross RL, Reid JVO, Newberne PM, Burgess B, Marston R, Hift W. Depressed cell-mediated immunity in megaloblastic anemia due to folic acid deficiency. Am J Clin Nutr 1975;28:225–232.
[34] Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:3290–3295.
[35] Dianov GL, Timchenko TV, Sinitsina OI, Kuzminov AV, Medvedev OA, Salganik RI. Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in double-strand break and deletion formation. Mol Gen Genet 1991;225:448–452.
[36] Popescu NC, DiPaolo JA, Amsbaugh SC. Integration sites of human papillomavirus 18 DNA sequence on HeLa cell chromosomes. Cytogenet Cell Genet 1987;44:58–62.
[37] Brechot C, Hadchouel M, Scotto J, Fonck M, Potet F, Vyas GN, et al. State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and -negative liver diseases. Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:3906–3910.
[38] Yoffe B, Burns DK, Bhatt HS, Combes B. Extrahepatic hepatitis B virus DNA sequences in patients with acute hepatitis B infection. Hepatology 1990;12:187–192.
[39] Gueant JL, Chabi N, Gueant-Rodriguez RM, Mutchinick O, Debard R, Payet C, et al. Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C > G variant in the transcobalamin gene (TCN2). J Med Genet 2007;44:363–367.
[40] Donaldson PT, Czaja AJ. Genetic effects on susceptibility, clinical expression, and treatment outcome of type 1 autoimmune hepatitis. Clin Liver Dis 2002;6:707–725.
[41] Mansur AH, Williams GA, Bishop DT, Markham AF, Lewis S, Britton J, et al. Evidence for a role of HLA DRB1 alleles in the control of IgE levels, strengthened by interacting TCR A/D marker alleles. Clin Exp Allergy 2000;30:1371–1378.
[42] Cavestro GM, Frulloni L, Neri TM, Seghini P, Nouvenne A, Zanetti A, et al. Association of HLA-DRB1*0401 allele with chronic pancreatitis. Pancreas 2003;26:388–391.
[43] Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, et al. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. Lancet 1996;347:1212–1217.
[44] Andrade RJ, Lucena MI, Alonso A, Garcia-Cortes M, Garcia-Ruiz E, Benitez R, et al. HLA class II genotype influences the type of liver injury in drug-induced idiosyncratic liver disease. Hepatology 2004;39:1603–1612.
[45] Jiao J, Wang JB. Hepatitis C virus genotypes, HLA-DRB alleles and their response to interferon-alpha and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2005;4:80–83.
[46] Chu RH, Ma LX, Wang G, Shao LH. Influence of HLA-DRB1 alleles and HBV genotypes on interferon-alpha therapy for chronic hepatitis B. World J Gastroenterol 2005;11:4753–4757.

4. Déterminants nutritionnels et génétiques du métabolime des monocarbones : association avec la gravité du paludisme en afrique de l'Ouest.

4.1. Résultats

4.1.1. Caractéristiques de la population étudiée selon le sexe

La population étudiée comportait principalement des enfants, avec un sexe ratio équilibré, correspondant effectivement à 238 filles et 255 garçons. L'âge maximum de la population est de 24 ans, car il existe quelques adultes jeunes, notamment des femmes, ce qui explique la différence de poids en fonction du sexe (17,0 Kg pour les filles et 13,5Kg pour les garçons avec p= 0,0005). Il existe également une différence liée au sexe pour l'ALAT et pour l'acide méthylmalonique respectiement (14UI/L chez les filles contre 17UI/L avec les garçons et une valeur de p=0,0025) pour l'ALAT et (2,2 µmol/l chez les filles contre 2,3 µmol/L pour les garçons et p= 0,0034) en ce qui est de l'acide méthylmalonique dont les valeurs sont exprirmées en log10 (Tableau 6).

Tableau 6. Descriptif général des déterminants du paludisme en fonction du sexe.

	Filles (n = 238)	Garçons (n = 255)	
	Médiane (25ème – 75ème percentile)	Médiane (25ème – 75ème percentile)	p
Age (mois)	84,0 (27,0 – 288,0)	42,0 (24,0 – 129,0)	**0,0005**
Poids (Kg)	17,0 (10,0 – 52,0)	13,5 (10 - 25,5)	**0,0208**
Parasitémie (parasites/µL)	24000,0 (4352,0-101230,0)	29365,0 (3846,0 -135170,0)	0,6803
Hémoglobine (g/dL)	8,3 (5,6 - 10,2)	7,5 (5,8 - 9,9)	0,5435
ALAT (UI/L)	14,0 (9,0 – 20,8)	17,0 (11,0- 27,0)	**0,0025**
Homocystéine (µmol/L)	11,2 (7,7 - 15,8)	12,1 (8,0 - 16,6)	0,1189
Folates (nmol/L)	11,8 (6,0 - 30,2)	14,1 (6,8 - 31,0)	0,2494
Vitamine B12 (pmol/L)	372,5 (252,0 – 525,0)	344,5 (219,0 - 560,5)	0, 4036
Holo-TC (pmol/L)	59,2 (37,8- 95,8)	55,0 (37,1 - 105,4)	0,5611
SOD (UI/mL)	310,0 (250,0 -357,5)	306,0 (238,0 - 355,0)	0,7152
GSH-Px (UI/mL)	900,0 (425,0 – 1590,7)	933,0 (699,8 – 1266,0)	0,1017
AMM[a] (µmol/L)	2,2 (2,0 - 2,4)	2,3 (2,1 - 2,6)	**0,0034**

[a] Valeur transformée en log10 ; ALAT : transaminase GTP ; Holo-TC : Holo-Transcobalamine ; SOD : superoxyde dismutase ; GSH-Px : Glutathion peroxydase ; AMM : acide méthylmalonique.
Le tabbeau montre une différence significative liée au sexe pour la concentration en ALAT et AMM (Alat 17 UI/L chez les garçons contre 14UI/L chez les filles, p=0,0025 ; AMM 2,3 µmol/L pour les garçons et 2,2 µmol/L pour les filles, p=0,0034).

4.1.2. Déterminants cliniques et biologiques par gravité du paludisme

Nous avons pris en compte dans notre étude l'ensemble des paramètres cliniques et biologiques retenus dans les critères de gravité du paludisme selon l'OMS. La classification en forme simple et forme grave repose sur les critères OMS de 2003. La comparaison des deux groupes confirme des données bien établies dans la littérature. Les formes graves sont plus fréquentes chez les enfants les plus jeunes (30 mois dans les formes graves contre 168 mois dans les formes simples, p<0,0001). Il y a également une différence importante de la concentration en hémoglobine (6,3 g/dL dans les formes graves contre 10,2 g/dL pour les formes simples, p<0,0001) (Tableau 7).

Tableau 7. Déterminants cliniques et biologiques par gravité du paludisme, selon l'organisation mondiale pour la santé (OMS) (Imbert et al., Bull Soc Pathol Exot, 2003).

Variable	**Simple** (238)	**Grave** (255)	
	Médiane (25ème – 75ème percentile)	Médiane (25ème – 75ème percentile)	p
Age (mois)	168,0 (63,0 - 336,0)	30,0 (18,0- 72,0)	**<0,0001**
Poids (Kg)	35,0 (15,0- 59,0)	12,0 (10,0- 16,0)	**<0,0001**
Parasitémie [a] (parasites/µL)	4,0 (3,0 - 4,6)	4,9 (4,2 - 5,4)	**<0,0001**
BIOLOGIE			
Hémoglobine (g/dL)	10,2 (8,7 – 11,4)	6,3 (5,0 – 8,0)	**<0,0001**
ALAT (UI/L)	13,0 (9,0 – 19,0)	19,0 (11,8 – 29,0)	**<0,0001**
Homocystéine (µmol/L)	12,9 (9,0-17,2)	10,1 (6,7-14,2)	**<0,0001**
Folates (nmol/L)	8,9 (4,7 - 18,9)	20,9 (9,8 - 42,7)	**< 0,0001**
Vitamine B12 (pmol/L)	359,0 (252,0 - 510,2)	363,0 (200,5 – 611,0)	0,7563
Holo-TC (pmol/L)	59,4 (36,8 - 86,2)	53,2 (34,6 - 109,4)	0,9284
AMM (µmol/L)	175,2 (117,9- 258,6)	194,0 (119,6- 325,4)	0,4117
GSH-Px (UI/L GR)	950,0 (766,0 – 1599,0)	916,5 (400,0 – 1233,0)	0,1663
SOD (UI/mL GR)	306,0 (239,3 – 351,0)	315,0 (244,0 – 367,8)	0,4959

[a] valeur transformée en log10, ALAT : transaminase GTP ; Holo-TC : Holo-Transcobalamine ; SOD : superoxyde dismutase ; GR : globules rouges ; GSH-Px : Glutathion peroxydase ; AMM : acide méthylmalonique.

O*n* remarque une associaton très significative des folates et de l'Hcy avec la gravité du paludisme p<0,0001. On voit ici que la concentration en folates est proportionnelle à la gravité du paludisme. Cela montre que les folates sont un facteur déterminant de la gravité du paludisme.

Concernant les critères biologiques liés au métabolisme de l'homocystéine, on peut noter une concentration plus élevée en vitamine B12 et en folates dans les formes graves respectivement (363 pmol/L pour la forme grave contre 359 pmol/L pour celle simple en vitamine B12, et 20,9 nmol/L dans les formes graves contre 8,9 nmol/L dans les formes simples pour les folates), qui explique probablement la concentration plus faible en homocystéine (10,1 µmo/L dans les formes graves contre 12,9 µmol/L pour les formes simples) (Tableau 2).

Il n'y a pas de carence en folates et pas d'anomalie de la reméthylation de l'homocystéine puisque l'homocystéine est plus basse dans les formes graves. Par contre et paradoxalement, il existe une concentration plus faible en holo TC (53,2 pmol/L dans les formes graves contre 59,4 pmol/L pour les formes simples, p=0,9284); et plus élevée en acide méthylmalonique (194 µmol/L dans les formes graves contre 175,2 µmol/L pour les formes simples, p= 0,4117), à la limite de la significativité (Tableau 6). Ceci suggère que les conséquences intracellulaires de la diminution de la biodisponibilité en vitamine B12 portent plutôt sur son métabolisme mitochondrial que sur son métabolisme cytoplasmique.

4.1.3. Quels sont les principaux paramètres de gravité en association avec l'âge et le sexe chez le paludéen ?

L'analyse multivariée, en reprenant en compte l'âge et le sexe en fonction des différences observées en analyse univariée retrouve comme paramètres principaux d'association au paludisme grave le poids, la parasitémie et les folates avec des valeurs de p respectives p<0,0001; p =0,0002 et p<0,0001 (Tableau 8).

Tableau 8. Déterminants cliniques et biologiques du paludisme grave en analyse multivariée.

Variable	Coefficient de régression	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95%	p
Age (mois)	0,0010	0,0010	1,0 (0,9-1,0)	0,3065
Sexe (masculin)	-0,2980	0,2410	0,7 (0,5-1,2)	0,2166
Poids (Kg)	-0,0580	0,0110	0,9 (0,9-1,0)	**<0,0001**
Parasitémie[a] (parasites/µL)	0,1370	0,0360	1,1 (1,1-1,2)	**0,0002**
Folates[a] (nmol/L)	1,2950	0,3190	3,6 (1,9-6,8)	**<0,0001**

[a] valeur transformée en log 10. Après ajustement sur le sexe en analyse multivariée l'on remarque que ce sont les enfants de sexe masculin qui sont les plus touchés par le paludisme grave.

Les déterminants de la parasitémie sont l'hémoglobine, l'homocystéine dans les formes graves et l'homocystéine et les folates dans les formes simples (Tableau 9). Au total ces résultats suggèrent qu'il existe une diminution de la biodisponibilité cellulaire en vitamine B12 qui se traduit par une élévation modérée en acide méthylmalonique.

Tableau 9. Déterminants de la parasitémie en analyse multivariée selon la gravité du paludisme

Variable	***Simple*** Coefficient de regression	Erreur standard	p	***Grave*** Coefficient de regression	Erreur standard	P
Hémoglobine[a] (g/dL)	0,7670	0,1960	**0,0002**	0,1290	0,1310	0,3265
Folates[a] (nmol/L)	-0,1500	0,0400	**0,0022**	-0,0930	0,0350	**0,0093**
Holo-TC[a] (pmol/L)	-0,0510	0,0510	0,3228	-0,0020	0,0380	0,9665

[a] valeur transformée en log10, Holo-TC Holo-transcobalamine.

4.1.4. Existe –t-il une association des polymorphismes du métabolisme de l'homocystéine avec les formes de paludisme ?

L'analyse de l'association des polymorphismes du métabolisme de l'homocystéine avec les formes graves de paludisme ne retrouve pas de différence, tant au niveau des génotypes que des allèles pour *MTHFR*, *MTR*, et *MTRR*. Par contre, l'allèle G du polymorphisme *TCN 776 C>G* est plus fréquent dans les formes graves (Tableau 10).

Tableau 10. Distribution génotypique et allélique des polymorphismes du métabolisme de l'homocystéine en fonction de la gravité du paludisme.

Polymorphisme	Forme de Paludisme Simple (238) n (%)	Grave (255) n (%)	p
MTHR 677 C >T N= 470			
CC	197 (86,8%)	210 (85,0%)	
CT	29 (12,8%)	35 (14,2%)	
TT	1 (0,4%)	2 (0,8%)	0,7914
Allèle *C*	423 (93,2%)	455 (92,1%)	
Allèle *T*	31 (6,8%)	39 (7,9%)	0,5305
MTHFR 1298 A > C N = 470			
AA	166 (74,4%)	170 (68,9%)	
AC	49 (22,0 %)	67 (27,1%)	
CC	8 (3,6%)	10 (4,0%)	0,3981
Allèle *A*	381 (85,4%)	407 (82,4%)	
Allèle *C*	65 (14,6%)	87 (17,6%)	0,2066
MTR 2756 A > G N= 467			
AA	117 (51,8%)	122 (50,6%)	
AG	93 (41,1%)	93 (38,6%)	
GG	16 (7,1%)	26 (10,8%)	0,3668
Allèle *A*	327 (72,3%)	337 (70%)	
Allèle *G*	125 (27,7%)	145 (30%)	0,4133
MTRR 66 A > G N = 468			
AA	128 (56,4%)	133 (55,2%)	
AG	78 (34,4%)	89 (36,9%)	
GG	21 (9,2%)	19 (7,9%)	0,7780
Allèle *A*	334 (73,6%)	335 (72,5%)	
Allèle *G*	120 (26,4%)	127 (27,5%)	0,7184
TCN 776 C > G N= 490			
CC	189 (79,7%)	176 (69,6%)	
CG	42 (17,8%)	64 (25,3%)	
GG	6 (2,5%)	13 (5,1%)	**0,0288**
Allèle *C*	420 (88,6%)	416 (82,2%)	
Allèle *G*	54 (11,4%)	90 (17,8%)	**0,0047**

Ce résultat est à rapprocher des paramètres métaboliques, qui montrent une concentration plus faible en pourcentage de vitamine B12 liée à la TC, chez les porteurs de l'allèle G. Il n'existe pas d'association entre l'acide méthylmalonique et ce polymorphisme, en prenant en compte l'ensemble de la population. Par contre, on observe une concentration plus élevée de l'acide méthylmalonique chez les porteurs du génotype *GG* en considérant les patients ayant une concentration en vitamine B12 dans le quartile inférieur de la distribution (0 – 225 pmol/L)

(Figure14).

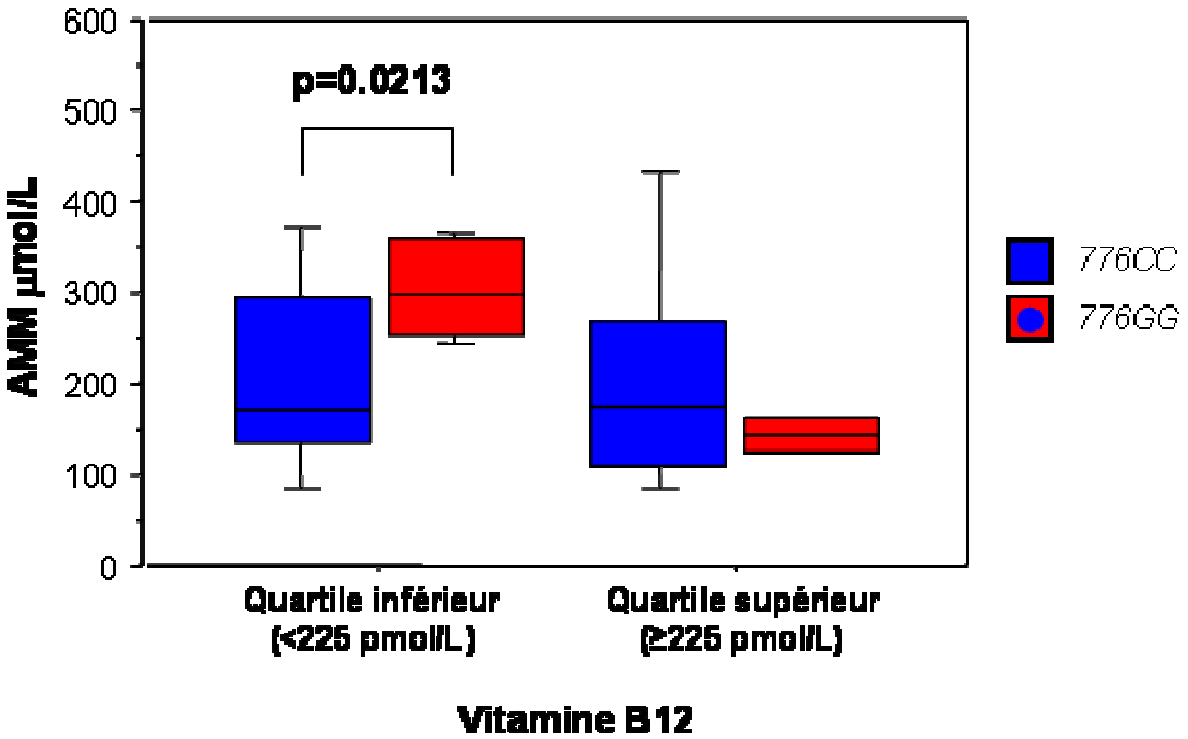


Figure 14. Concentration en acide méthylmalonique en relation aux quartiles de vitamine B12 et au polymorphisme de la TCN2. Le graphe montre que les porteurs du génotype *TCN 776 GG* ont une concentration élèvée en AMM pour une concentration basse de vitamine B12.

Il existe également une association à la limite de la significativité pour la concentration en holo-TC et la concentration en vitamine B12 en transformé logarithmique, en comparant le génotype *776 GG* au génotype *776 CC*. Il existe également une association très significative entre l'allèle G et l'hémoglobine. Ce résultat est à rapprocher de l'association qui existe entre acide méthylmalonique et hémoglobine (Figures 15 et 16) et entre hémoglobine et parasitémie.

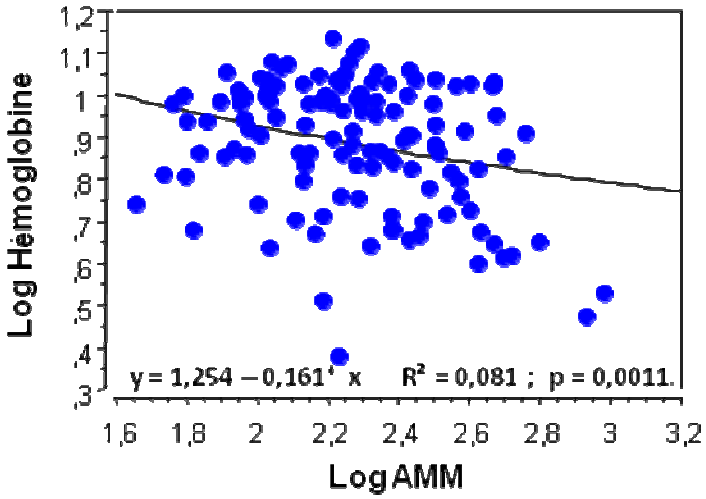


Figure 15. Association acide méthylmalonique (AMM) et hémoglobine.

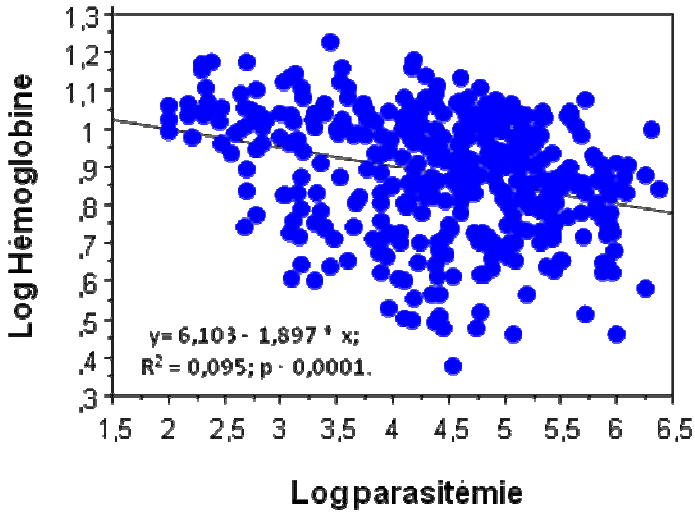


Figure 16. Association hémoglobine et parasitémie. Les figures 15 et 16 montrent une association négative avec la concentration en hémoglobine et AMM et la parasitémie, autrement dit quand la concentration en hémoglobine baisse celle de l'AMM ou la parasitémie augmente et inversement.

Par contre, il n'existe pas d'association significative entre la concentration en acide méthylmalonique et parasitémie. Ces résultats montrent donc que la biodisponibilité cellulaire en vitamine B12 est un paramètre critique déterminant la concentration en hémoglobine dans les formes graves, mais qu'il n'est pas directement de lien avec ces formes graves.

Ces résultats sont également en parfaite cohérence avec l'association qui existe entre les porteurs de l'allèle G et la concentration en hémoglobine d'une part, et l'association entre les porteurs de l'allèle G et les formes graves.

La parasitémie n'est pas associée au statut en vitamine B12, en particulier il n'y a pas de corrélation avec la vitamine B12, l'holo-TC et l'acide méthylmalonique. Il existe par contre une association très significative de la parasitémie avec la concentration en folates dans les formes simples, c'est-à-dire que les folates augmentent proportionnellement en fonction du taux de parasitémie, et de manière opposée l'homocystéine diminue proportionnellement au taux de parasitémie dans les formes graves (Figures 17 et 18).

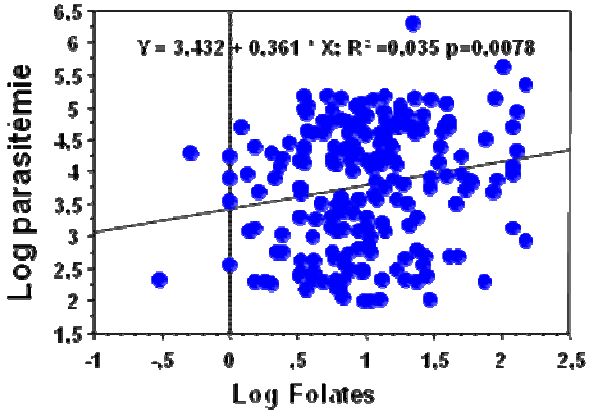


Figure 17. Assocation parasitémie et folates dans les formes simples.

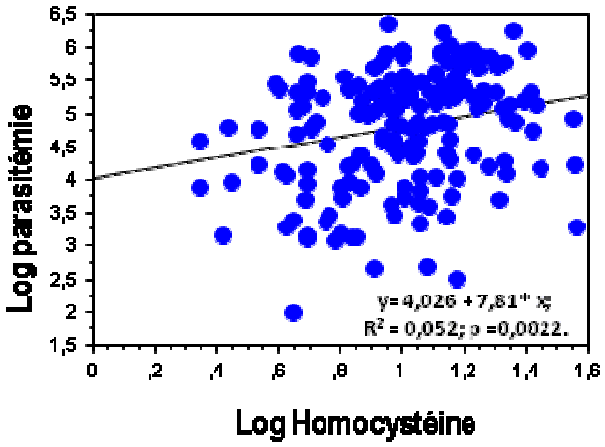


Figure 18. Association parasitémie et concentration en homocystéine dans les formes graves.

Il semble donc que les folates constituent un facteur de risque pour les formes graves, résultat à rapprocher de ceux obtenus il y a deux ans dans une étude d'intervention qui montrait que la supplémentation en folates, dans une population d'enfants de l'Afrique de l'ouest, augmentait l'évolution vers une forme grave de la maladie.

En conclusion, nous avons trouvé une association significative entre les déterminants nutritionnels et génétiques du métabolisme des monocarbones et la gravité du paludisme, avec une différence évidente dans les implications et rôles respectifs de la vitamine B12 et des folates. La diminution de la biodisponibilité cellulaire de la vitamine B12 qui est notamment conditionnée par le polymorphisme génétique de la transcobalamine 2, est un élément déterminant de la concentration en hémoglobine et donc de l'anémie. Par contre, les folates semblent avoir un effet direct sur la parasitémie, mécanisme qui reste à déterminer. C'est ce mécanisme qui explique la concentration en homocystéine plus faible dans les formes graves, ce qui suggère que l'augmentation de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine constitue un élément favorable au développement du parasite. Il est donc possible que la vitamine B12 au niveau des cellules hôtes du parasite, notamment au niveau de l'érythropoïèse soit utilisée de manière préférentielle par la voie de réméthylation, qui est augmentée et non diminuée malgré la diminution de la biodisponibilité en vitamine B12, dans un contexte où la concentration en folates est augmentée. Parallèlement, cette utilisation préférentielle produit probablement un déficit mitochondrial en vitamine B12, se traduisant par une augmentation en acide méthylmalonique. C'est cette deuxième voie métabolique de la vitamine B12 qui semble impliquée dans l'association avec l'anémie des formes graves.

5. Déterminants nutritionnels et génétiques du métabolime des monocarbones : association avec l'obésité et le syndrome métabolique.

But de l'étude

L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque pour les maladies cardio-vasculaires. Le risque de maladie cardiovasculaire est également associé avec les déterminants nutritionnels de l'homocystéine, et notamment les folates et la vitamine B12 et les déterminants génétiques. Parmi ceux-ci, *MTHFR*, *MTR* et *MTRR* ont fait l'objet de nombreuses études cas-témoins, pour lesquels des résultats contradictoires ont été produits. Ceci suggère une influence complexe mettant en jeu le statut nutritionnel et d'autres facteurs environnementaux. Les mécanismes d'association de l'homocystéine avec les maladies cardiovasculaires sont complexes et impliquent notamment la dysfonction endothéliale, avec une association avec l'hypertension artérielle, mais aussi l'augmentation du risque thrombo-embolique et plus récemment l'association à la fraction d'éjection systolique. L'homocystéine est également associée dans plusieurs études cas-témoins avec la CRP, marqueur de l'inflammation, et avec le cholestérol. Très récemment, deux études menées à la fois sur les modèles animaux et sur des groupes restreints de patients coronariens ont montré une association d'ApoA et des HDLs avec l'homocystéine. Les deux études évoquent une inhibition de la synthèse de l'ApoA et une augmentation de la clairance des HDL chez des souris ayant respectivement une invalidation pour le gène *MTHFR* et pour le gène *CBS*. Au total, il existe une association de l'homocystéine, bien que de manière inconstante, dans les études de population et les modèles expérimentaux, avec plusieurs déterminants du syndrome métabolique, dont les marqueurs lipidiques, l'inflammation et l'hypertension artérielle systolique. L'objet de notre étude a donc été d'évaluer l'association de l'homocystéine et de ses déterminants nutritionnels et génétiques avec les paramètres cliniques et biologiques du syndrome métabolique, en

prenant comme critères diagnostiques ceux de *l'International Diabetes Federation* (2005) dans une population d'Afrique de l'ouest recrutée au Bénin, sur deux sites. Dans la mesure où nous avons observé dans la première phase de notre étude une différence très significativement supérieure de la prévalence du syndrome métabolique chez les femmes par rapport aux hommes, nous avons complété cette étude par un recrutement supplémentaire de femmes sur le marché Dantokpa à Cotonou. Au total, l'étude a donc été réalisée sur 927 volontaires dont 678 femmes.

5.1. Etude comparative du syndrome métabolique dans les populations enquêtées

On observe une prévalence du syndrome métabolique très significativement supérieure chez les femmes (Tableau 11) avec une fréquence environ 3,5 fois supérieure à celle observée chez les hommes respectivement 26,9% contre 8,4%. La prévalence du syndrome métabolique chez les femmes du marché Dantokpa est par ailleurs comparable à celle observée dans le recrutement Cotonou phase 2 (25,9% vs 25,1%) et légèrement inférieure à celle observée dans le premier groupe recruté à Cotonou (38,2%) (Tableau 11). D'un point de vue socio-économique, les deux populations sont différentes : les femmes du marché Dantokpa ont un bon niveau socioéconomique et exerce une activité de commerçante. L'autre population recrutée à Cotonou est plus représentative de l'échantillon global de la population.

Tableau 11. Fréquence du Syndrome Métabolique, selon la classification IDF (Moebus et al., Cardiovascular Diabetology, 2007).

	Syndrome Métabolique toute la population (n= 927)		Syndrome Métabolique femmes (n= 678)		Syndrome Métabolique hommes (n= 249)	
	oui	non	oui	non	oui	non
Cotonou phase 1	45 (4,8%)	133 (14,4%)	34 (38,2%)	55 (61,8%)	11(12,4%)	78 (87,6%)
Cotonou phase 2	53 (5,7%)	273 (29,4%)	43 (25,9%)	123 (74,1%)	10 (6,2%)	150 (93,8%)
Dantokpa	106 (11,4%)	317 (34,2%)	106 (25,1%)	317 (74,9%)		
Total	204 (22,0%)	723 (78,0%)	**183***(26,9%)	**495*** (73,1%)	**21*** (8,4%)	**228*** (91,6%)

*Test de Chi-2 p <0,0001. Le tableau montre une prévalence de SM de 26,9% chez les femmes contre 8,4% chez les hommes.

5.2. Le syndrome métabolique est-il en lien avec le métabolisme de l'homocystéine ?

Nous avons donc étudié l'association avec le sexe et l'ensemble des marqueurs cliniques et biologiques en lien avec le syndrome métabolique et avec le métabolisme de l'homocystéine. Cependant, il faut noter que nous n'avons pu mesurer la créatinine que dans la population recrutée sur le marché Dantokpa.

Ce descriptif général (Tableau 12) montre un index de masse corporelle très significativement inférieur chez les hommes ; (28,9 [23,8-33,3] chez les femmes contre 21,3 [19,6-24,1] chez les hommes, p<0,0001), un tour de taille également inférieur ; (91,0 [80,0-99,0] chez les femmes pour 78,6 [74,2-88,5] chez les hommes, p<0,0001).

Il existe par ailleurs chez les femmes, sur le plan biologique, une augmentation importante de l'insulinémie respectivement 18,7 µU/mL (11,8-27,6) chez les femmes et 8,2 µU/mL (5,5-14,1) chez les hommes, p<0,0001 ; une concentration plus élevée en cholestérol, LDL-cholestérol, ainsi qu'en HDL-cholestérol successivement chez les femmes et les hommes; 1,6g/L (1,4-1,9) et 1,4g/L (1,1-1,6) pour le cholestérol total avec une valeur de p<0,0001;

1,0g/L (0,8-1,3) contre 0,9g/L (0,7-1,1) pour LDL-cholestérol, p<0,0001 et 0,4 (0,3-0,5) contre 0,3 (0,3-0,4), p<0,0001. Par contre, il n'existe pas de différence pour les triglycérides.

Sur le plan du métabolisme de l'homocystéine, il existe une différence significative de la concentration en homocystéine et en folates. L'Hcy est plus élevée chez les hommes que chez les femmes respectivement ; 16,3µmol/L (13,0-22,2) contre 11,4µmol/L (9,1-14,0), p<0,0001 ; et faible en folates chez les hommes que chez les femmes 5,8 nmol/L (4,2-8,0) contre 6,1 nmol/L (4,7-8,7), p = 0,0307. On observe une concentration plus élevée en vitamine B12 qui est de 467,0 (342,0-609,0) chez les femmes contre 384,0 (274,0-522,0) chez les hommes, p<0,0001 (Tableau 12). Il existe une activité plus élevée en ASAT chez les hommes 29,0 (23,0-37,0) contre 21,0 (19,0-26,0) chez les femmes avec p<0,0001. On peut donc retenir que l'augmentation de la concentration en vitamine B12 n'est pas liée à une cytolyse hépatique.

Tableau 12. Descriptif général des déterminants cliniques et biologiques.

	Femmes (n =678)	Hommes (n =249)	
Variable	Médiane (25ème – 75ème percentile)	Médiane (25ème – 75ème percentile)	p
Age (ans)	40 (30-49)	35 (28-44)	**0,0008**
Poids (Kg)	74 (61-86)	64 (57-72)	**<0,0001**
Taille (m)	1,6 (1,5-1,7)	1,7 (1,6-1,8)	**<0,0001**
Tour de taille (cm)	91,0 (80,0-99,0)	78,6 (74,2-88,5)	**<0,0001**
Tour de hanche (cm) [a]	110,0 (102,0-120,0)		-
Taille/Hanche [a]	0,8 (0,8-,9)		-
IMC (Kg/m²)	28,9 (23,8-33,3)	21,3 (19,6-24,1)	**<0,0001**
Tour de taille (cm)	91,0 (80,0-99,0)	78,6 (74,2-88,5)	**<0,0001**
PAS (mm Hg)	120,0 (110,0-136,0)	120,0 (110,0-130,0)	0,4089
PAD (mm Hg)	80,0 (70,0-84,0)	80,0 (70,0-80,0)	0,5932
Insuline (µU/mL)	18,7 (11,8-27,6)	8,2 (5,5-14,1)	**<0,0001**
CRP (mg/L)	1,7 (0,7-4,3)	1,1 (0,6-2,7)	**0,0005**
Apo A1 (g/L)	1,6 (1,4-1,9)	1,3 (1,2-1,5)	**<0,0001**
Apo B (g/L)	0,8 (0,7-0,9)	0,7 (0,5-0,8)	**<0,0001**
Albumine (g/L) [a]	39,6 (36,9-42,1)		-
Sodium (mmol/L) [a]	139,0 (137,0-142,0)		-
Potassium (mmol/L) [a]	4,5 (4,2-4,8)		-

Chlore (mmol/L) [a]	106,0 (104,0-107,0)		-
Protéines (g/L) [a]	75,0 (71,0-77,0)		-
Urée (g/L) [a]	0,2(0,1-0,2)		-
Créatinine [a]	8,9 (8-9,6)		-
Glucose (g/L)	0,79 (0,74-0,85)	0,82 (0,77-0,88)	**<0,0001**
Cholestérol (g/L)	1,6 (1,4-1,9)	1,4 (1,1-1,6)	**<0,0001**
Triglycérides (g/L)	0,6 (0,4-0,7)	0,6 (0,5-0,7)	0,7281
HDL-Cholestérol (g/L)	0,4 (0,3-0,5)	0,3 (0,3-0,4)	**<0,0001**
LDL-Cholestérol (g/L)	1,0 (0,8-1,3)	0,9 (0,7-1,1)	**<0,0001**
Acide urique (mg/L)	44,0 (38,0-50,0)	53,0 (48,0-61,0)	**<0,0001**
Phosphore (mg/L) [a]	37,0 (34,0-41,0)		-
Calcium (mg/L) [a]	94,0 (91,0-96,0)		-
Phosphatase alcaline (UI/L) [a]	60,0 (47,0-75,0)		-
Bilirubine totale (mg/L) [a]	4,0 (3,0-5,0)		-
ALAT (UI/L)	10,0 (7,0-13,0)	9,0 (6,0-12,0)	0,1431
ASAT (UI/L)	21,0 (19,0-26,0)	29,0 (23,0-37,0)	**<0,0001**
Fer (mg/L)	0,7 (0,5-0,9)	0,9 (0,8-1,2)	**<0,0001**
Homocystéine (µmolL)	11,4 (9,1-14)	16,3 (13-22,2)	**<0,0001**
Folates (Vit B9) (nmol/L)	6,1 (4,7-8,7)	5,8 (4,2-8,0)	**0,0307**
Vitamine B12 (pmol/L)	467,0 (342,0-609,0)	384,0 (274,0-522,0)	**<0,0001**

IMC Indice de masse corporelle, PAS Pression artérielle systolique, PAD Pression artérielle diastolique, [a] paramètres effectués sur les échantillons du marché Dantokpa.
Le tableau montre qu'il existe une différence significative entre les femmes et les hommes sur les déterminants cliniques et biologiques. Par contre, il n'y a pas de différnce pour la pression artielle et les triglycérides.

5.3. Le syndrome métabolique est-il associé aux déterminants cliniques et biologiques après stratification selon le sexe ?

Il ressort de cette analyse que la plupart des déterminants sont significativement associés au syndrome métabolique tant chez les hommes que chez les femmes. Il faut cependant noter chez les hommes l'absence d'association avec la CRP et une différence plus faible pour les triglycérides, p= 0,0190, et le HDL-cholestérol, p= 0,0150 (Tableau 13).

Tableau 13. Déterminants cliniques et biologiques du Syndrome Métabolique selon le sexe.

	Femmes (n =678)			Hommes (n = 249)		
	Syndrome Métabolique			Syndrome Métabolique		
Déterminants	Médiane (25ème – 75ème percentile) oui	Médiane (25ème – 75ème percentile) non	p*	Médiane (25ème – 75ème percentile) oui	Médiane (25ème – 75ème percentile) non	p*
Age (ans)	46,0 (40,0-55,0)	36,0 (28,0-45,0)	**<0,0001**	48,0 (43,0-54,0)	34,0 (28,0-43,0)	**<0,0001**
Poids (Kg)	79,0 (72,0-93,0)	72,0 (59,0-83,0)	**<0,0001**	86,6 (82,0-91,0)	63,2 (56,7-69,5)	**<0,0001**
Taille (m)	1,6 (1,5-1,6)	1,6 (1,5-1,6)	0,6910	1,8 (1,7-1,8)	1,7 (1,7-1,8)	0,1270
IMC (Kg/m²)	31,2 (27,8-35,5)	27,9 (22,8-32,6)	**<0,0001**	28,5 (26-30,2)	21,1 (19,4-23,4)	**<0,0001**
Tour de taille (cm)	97,5 (91,5-106,0)	88,0 (77,2-96,0)	**<0,0001**	101,0 (97,5-104,1)	78,1 (74,0-85,6)	**<0,0001**
Tour de hanche (cm)[a]	114,0 (106,0-127,0)	108,0 (101,0-118,0)	**<0,0001**			
Taille/Hanche [a]	0,9 (0,8-0,9)	0,8 (0,7-0,9)	**<0,0001**			
PAS (mm Hg)	140,0 (130,0-160,0)	118,0 (110,0-124,0)	**<0,0001**	140,0 (130,0-150,0)	120,0 (110,0-123,5)	**<0,0001**
PAD (mm Hg)	90,0 (80,0-100,0)	70,0 (68,0-80,0)	**<0,0001**	90,0 (80,0-90,0)	80,0 (70,0-80,0)	**<0,0001**
Insuline (µu/mL)	19,1 (12,5-29,6)	18,5 (11,4-2,6)	0,1690	14,1 (7,1-20,6)	7,9 (5,5-13,4)	**0,0070**
CRP (mg/L)	3,1 (1,2-5,9)	1,4 (0,6-3,4)	**<0,0001**	1,9 (1-5,1)	1,1 (0,6-2,6)	0,3920
Apoliprotéine A1 (g/L)	1,6 (1,3-1,8)	1,7 (1,4-1,9)	0,0570	1,2 (1,1-1,4)	1,3 (1,1-1,5)	0,0670
Apolipoprotéine B (g/L)	0,8 (0,7-1)	0,8 (0,6-0,9)	**<0,0001**	0,9 (0,8-1,1)	0,7 (0,5-0,8)	**<0,0001**
Albumine (g/L) [a]	39,7 (37,4-42,0)	39,5 (36,8-41,8)	0,1860			
Sodium (mmol/L) [a]	140,0 (138,0-142,0)	139 (137-141)	**0,0070**			
Potassium (mmol/L) [a]	4,4 (4,2-4,8)	4,5 (4,3-4,8)	0,2450			
Chlore (mmol/L) [a]	106,0 (104,0-108,0)	106,0 (104,0-107,0)	0,4800			
Protéines (g/L) [a]	77,0 (73,0-79,0)	74,0 (70,0-77,0)	**0,0010**			
Urée (g/L) [a]	0,2 (0,1-0,2)	0,2 (0,1-0,2)	**0,0010**			
Créatinine (mg/L) [a]	9,0 (8,1-9,8)	8,9 (8-9,5)	0,5240			
Glucose (g/L)	0,81 (0,76-0,89)	0,78 (0,73-0,84)	**<0,0001**	0,89 (0,84-0,95)	0,81 (0,76-0,87)	**<0,0001**
Chloestérol total (g/L)	1,7 (1,4-1,9)	1,6 (1,4-1,9)	**0,0420**	1,6 (1,4-1,8)	1,3 (1,1-1,6)	**0,0180**
Triglycérides (g/L)	0,6 (0,5-0,8)	0,5 (0,4-0,7)	**<0,0001**	0,6 (0,6-0,8)	0,6 (0,4-0,7)	**0,0190**

HDL-cholestérol (g/L)	0,4 (0,3-0,4)	0,5 (0,4-0,6)	**<0,0001**	0,3 (0,2-0,3)	0,3 (0,3-0,4)	**0,0150**
LDL-cholestérol (g/L)	1,1 (0,9-1,4)	1,0 (0,8-1,2)	**<0,0001**	1,1 (0,9-1,4)	0,9 (0,7-1,1)	**0,0010**
Acide urique (mg/L)	48,0 (42,0-54,0)	43,0 (36,0-49,0)	**<0,0001**	61 (54,0-71,0)	53,0 (48,0-59,0)	**0,0010**
Phosphore (mg/L) [a]	37,0 (34,0-40,0)	37,0 (34,0-41,0)	0,9010			
Calcium (mg/L) [a]	94,0 (91,0-94,0)	93,0 (91,0-96,0)	0,7840			
Phosphatase alcaline	68,0 (51,0-81,0)	58,0 (46,0-71,0)	**0,0010**			
Bilirubine totale (mg/L) [a]	4,0 (3,0-5,0)	4,0 (3,0-5,0)	0,1220			
ALAT (UI/L)	10,0 (7,0-13,0)	9,0 (7,0-13,0)	0,3840	12,0 (9,0-14,0)	9,0 (6,0-12,0)	0,8510
ASAT (UI/L)	22,0 (19,0-26,0)	21,0 (18,0-26,0)	0,3370	30,0 (24,0-37,0)	29,0 (23,0-36,5)	0,9150
Fer (mg/L)	0,7 (0,5-0,9)	0,7 (0,5-0,9)	0,4510	1,0 (0,8-1,1)	0,9 (0,8-1,2)	0,7710
Homocystéine (µmol/L)	12,4 (10,1-16,0)	11,0 (8,8-13,1)	**<0,0001**	17,6 (13,6-23,9)	16,1 (13-22,1)	**0,0280**
Folates (vitamine B9)	5,9 (4,2-8,6)	6,2 (4,8- 8,8)	0,1140	6,3 (4,5-8,7)	5,8 (4,2-7,9)	0,7320
Vitamine B12 (pmol/L)	422,0 (304,0-586,0)	484,0 (364,0-622,0)	**0,0490**	340,0 (269,0-592,0)	388,0 (275,0-520,5)	0,2900

* Test de Mann-Whitney, [a] valeur des variables des échantillons des femmes du marché de Dantokpa, **IMC** indice de masse corporelle, **PAS** pression artérielle systolique, **PAD** pression artérielle diastolique, ALAT transaminase TGP, ASAT transaminase TGO.

On remarque sur ce tableau que la plupart des déterminants sont associés au syndrome métabolique ; les déterminants du SM sont fortement corrélés comme le prévoit la classification de l'IDF. On note aussi une association forte entre CRP, HDL-cholestérol, Hcy et vitamine B12 et modérément significative avec ApoA1 chez les femmes.

5.4. Existe-t-il une association entre les déterminants cliniques et biologiques du SM avec les déterminants lipidiques ?

La quatrième étape de notre analyse a été ciblée sur l'association des autres déterminants cliniques et biologiques du syndrome métabolique avec les déterminants lipidiques, en incluant également l'homocystéine, la vitamine B12 et les folates, avec une approche univariée et multivariée, et en considérant respectivement les femmes et les hommes (Tableaux 14.a à 14.f).

L'analyse univariée chez les femmes illustre la complexité des interactions dans la mesure où la plupart des déterminants sont associés aux marqueurs lipidiques. L'analyse multivariée permet de faire ressortir un certain nombre de points importants, au regard des données publiées dans la littérature. Ainsi ApoA1 est associée non seulement à l'inflammation et à l'insuline, mais également à la vitamine B12 avec des valeurs de p respectives : CRP, $p<0,0001$; insuline, $p = 0,0024$ et vitamine B12, $p =0,0008$; ce qui suggère un lien avec le métabolisme des donneurs de méthyl, à rapprocher avec les résultats obtenus par le groupe de Rima Rozen chez les souris invalidées pour le gène *MTHFR*. Par contre, le HDL-cholestérol est associé à la vitamine B12, $p<0,0001$; mais pas aux folates. Les folates sont associés à la concentration en ApoB, $p = 0,0110$ et en LDL-cholestérol, $p<0,0001$. Parallèlement, on observe une association entre le cholestérol total et la vitamine B12, $p=0,0077$, qui peut potentiellement être expliquée par l'association B12/ApoA1. Il faut cependant noter que l'association entre vitamine B12 et ApoA1 ou cholestérol est plus significative en multivariée qu'en analyse univariée (Tableaux 14.a à 14.c).

Chez les hommes, l'analyse univariée retrouve un certain nombre d'associations des déterminants cliniques et biologiques classiques avec les marqueurs lipidiques. Par contre il n'existe pas d'association significative entre l'homocystéine, la vitamine B9 ou la vitamine B12, et les marqueurs lipidiques en analyse multivariée (Tableaux 14.d à 14.f).

Tableau 14.a. Déterminants des apoliprotéines A1 et B en analyse uni et multivariée chez les femmes.

	Apolipoprotéine A1					**Apolipoprotéine B**				
	univariée		**multivariée**			**univariée**		**multivariée**		
	R^2 [a]	**p**	Coefficient de régression	Erreur standard	**p**	R^2 [a]	**p**	Coefficient de régression	Erreur standard	**p**
Age (ans)	0,0071	**0,0278**				0,0722	**<0,0001**			
Tour de taille (cm)	0,0107	**0,0071**	0,0028	0,0012	**0,0179**	0,0755	**<0,0001**			
PAS (mm Hg)	0,0092	**0,0125**				0,0492	**<0,0001**	0,0007	0,00028	**0,0176**
PAD (mm Hg)	0,0089	**0,0138**				0,0430	**<0,0001**			
Acide urique (mg/L)	0,0000	0,9804				0,0287	**<0,0001**			
CRP (mg/L)[b]	0,0159	**0,0010**	-0,1507	0,0287	**<0,0001**	0,0350	**<0,0001**	0,03919	0,0116	**0,0007**
Insuline (µU/mL) [b]	0,0297	**<0,0001**	0,1549	0,0508	**0,0024**	0,0503	**<0,0001**			
ALAT (UI/L) [b]	0,0121	**0,0042**				0,0745	**<0,0001**			
ASAT (UI/L) [b]	0,0120	**0,0043**				0,0065	**0,0363**			
Homocystéine (µmol/L) [b]	0,0000	0,9969				0,0195	**0,0003**			
Folates (nmol/L) [b]	0,0015	0,3078				0,0067	**0,0327**	-0,05688	0,0223	**0,0110**
Vitamine B12 (pmol/L) [b]	0,0081	**0,0193**	-0,2270	0,0672	**0,0008**	0,0025	0,1945			

[a] carré du coefficient de corrélation, [b] valeur transformée en log10, ALAT transaminase TGP, ASAT transaminase TGO.
En analyse univariée et multivariée, ApoA1 est associée au tour de taille à l'insuline, la CRP et la vitamine B12, mais modérément à la pression artérielle alors que ApoB est associée aux folates, à la CRP, et à la pression artérielle systolique.

Tableau 14.b. Déterminants des Triglycérides et du Cholestérol en analyse uni et multivariée chez les femmes.

	Triglycérides					**Cholestérol Total**				
	univariée		**multivariée**			**univariée**		**multivariée**		
	R^2 [a]	p	Coefficient de régression	Erreur standard	p	R^2 [a]	p	Coefficient de régression	Erreur standard	p
Age (ans)	0,0803	**<0,0001**	0,0020	0,0005	**<0,0001**	0,0545	**<0,0001**	0,0070	0,0012	**<0,0001**
Tour de taille (cm)	0,1246	**<0,0001**	0,0017	0,0005	**0,0003**	0,0364	**<0,0001**			
PAS (mm Hg)	0,0420	**<0,0001**				0,0302	**<0,0001**			
PAD (mm Hg)	0,0488	**<0,0001**				9,0246	**<0,0001**			
Acide urique (mg/L)	0,1002	**<0,0001**	0,0023	0,0006	**<0,0001**	0,0335	**<0,0001**	0,0046	0,0015	**0,0019**
CRP (mg/L) [b]	0,0829	**<0,0001**	0,0243	0,0109	**0,0271**	0,0029	0,1598	-0,0557	0,0269	**0,0389**
Insuline (µU/mL) [b]	0,0977	**<0,0001**	0,0771	0,0196	**<0,0001**	0,0446	**<0,0001**	0,1477	0,0501	**0,0033**
ALAT (UI/L) [b]	0,1005	**<0,0001**	0,2157	0,0271	**<0,0001**	0,0628	**<0,0001**	0,5051	0,0717	**<0,0001**
ASAT (UI/L) [b]	0,0001	0,7783	-0,0945	0,0396	**0,0171**	0,0084	**0,0168**	-0,5930	0,1032	**<0,0001**
Homocystéine (µmol/L) [b]	0,0212	**0,0001**				0,0058	**0,0482**			
Folates (nmol/L) [b]	0,0005	0,5808				0,0001	0,8060			
Vitamine B12 (pmol/L) [b]	0,0037	0,1128	-0,0508	0,0250	**0,0427**	0,0095	**0,0110**	0,1767	0,0662	**0,0077**

a carré du coefficient de corrélation, b valeur transformée en log10, ALAT transaminase TGP, ASAT transaminase TGO.

Les triglycérides et le cholestérol total sont fortement associés aux déterminants cliniques et biologiques en analyse uni et multivariée. L'assocition des triglycérides et cholestérol en univarée avec l'Hcy ne l'est plus en multivarée. Par contre leur association avec la vitamine B12 est encore perceptible en multivariée. Il n'y a pas d'association avec les folates.

Tableau 14. c. Déterminants de HDL-cholestérol et du LDL-cholestérol en analyse uni et multivariée chez les femmes.

	HDL-cholestérol					**LDL-cholestérol**				
	univariée		**multivariée**			**univariée**		**multivariée**		
	R^2 [a]	p	Coefficient de régression	Erreur standard	p	R^2 [a]	p	Coefficient de régression	Erreur standard	p
Age (ans)	0,0007	0,5056				0,0573	**<0,0001**			
Tour de taille (cm)	0,0123	**0,0039**				0,0495	**<0,0001**			
PAS (mm Hg)	0,0018	0,2748				0,0354	**<0,0001**			
PAD (mm Hg)	0,0005	0,5658				0,0280	**<0,0001**			
Acide urique (mg/L)	0,0032	0,1438				0,0369	**<0,0001**			
CRP (mg/L) [b]	0,0840	**<0,0001**	-0,0745	0,0089	**<0,0001**	0,0209	**0,0002**	0,0700	0,0096	**<0,0001**
Insuline (µU/mL) [b]	0,0270	**<0,0001**	0,1002	0,0171	**<0,0001**	0,0157	**0,0011**	-0,1153	0,0186	**<0,0001**
ALAT (UI/L) [b]	0,0120	**0,0043**	0,0486	0,0235	**0,0390**	0,0395	**<0,0001**			
ASAT (UI/L) [b]	0,0045	0,0824				0,0058	**0,0475**			
Homocystéine (µmol/L) [b]	0,0108	**0,0068**				0,0127	**0,0033**			
Folates (nmol/L) [b]	0,0155	**0,0011**				0,0048	0,0725	-0,0897	0,0195	**<0,0001**
Vitamine B12 (pmol/L) [b]	0,0071	**0,0285**	0,0778	0,0173	**<0,0001**	0,0039	0,1054			

[a] carré du coefficient de corrélation, [b] valeur transformée en log10, ALAT transaminase TGP, ASAT transaminase TGO.
En analyse uni et multivariée HDL et LDL sont significativement associés à la CRP et à l'insuline ; HDL est lié à la vitamine B12 tandis que le LDL est associé aux folates.

Tableau 14.d. Déterminants des apolipoprotéines A1 et B en analyse uni et multivariée chez les hommes.

	Apolipoprotéine A1					**Apolipoprotéine B**				
	univariée		**multivariée**			**univariée**		**multivariée**		
	R^2 [a]	p	Coefficient de régression	Erreur standard	p	R^2 [a]	p	Coefficient de régression	Erreur standard	p
Age (ans)	0,0218	**0,0198**	0,0042	0,0017	**0,0163**	0,0217	**0,0200**			
Tour de taille (cm)	0,0056	0,2412	-0,0066	0,0017	**0,0002**	0,1339	**<0,0001**	0,0029	0,0011	
PAS (mm Hg)	0,0043	0,3036				0,0062	0,2138			
PAD (mm Hg)	0,0032	0,3726				0,0001	0,8563			
Acide urique (mg/L)	0,0001	0,8704	-0,0038	0,0016	**0,0194**	0,1377	**<0,0001**			
CRP (mg/L) [b]	0,0470	**0,0006**	-0,0893	0,0330	**0,0073**	0,0012	0,5888			
Insuline (µU/mL) [b]	0,0062	0,2157				0,0468	**0,0006**	0,1273	0,0399	**0,0016**
ALAT (UI/L) [b]	0,0218	**0,0198**				0,1399	**<0,0001**			
ASAT (UI/L) [b]	0,0460	**0,0007**	0,3901	0,0861	**<0,0001**	0,0034	0,3592			
Homocystéine (µmol/L) [b]	0,0031	0,3851				0,0166	**0,0423**			
Folates (nmol/L) [b]	0,0024	0,4457				0,0014	0,5587			
Vitamine B12 (pmol/L) [b]	0,0023	0,4524				0,0230	**0,0166**			

[a] carré du coefficient de corrélation, [b] valeur transformée en log10, ALAT transaminase TGP, ASAT transaminase TGO.
Le tableau montre ici que chez les hommes ApoA1 est liée à la CRP, à ASAT et à l'acide urique alors que ApoB est associée à l'insuline, à la vitamine B12 et modeste à l'homocystéine.

Tableau 14.e. Déterminants des Triglycérides et du Cholestérol en analyse uni et multivariée chez les hommes.

	Triglycérides					**Cholestérol Total**				
	univariée		**multivariée**			**univariée**		**multivariée**		
	R^2 [a]	p	Coefficient de régression	Erreur standard	p	R^2 [a]	p	Coefficient de régression	Erreur standard	P
Age (ans)	0,0523	**0,0003**				0,0407	**0,0014**	0,0053	0,0020	**0,0204**
Tour de taille (cm)	0,1051	**<0,0001**	0,0024	0,0008	**0,0035**	0,0641	**<0,0001**	0,0058	0,0020	**0,0119**
PAS (mm Hg)	0,0148	0,0553				0,0037	0,3418			
PAD (mm Hg)	0,0001	0,8740				0,0014	0,5537	-0,0058	0,0020	**0,0033**
Acide urique (mg/L)	0,2252	**<0,0001**	0,0054	0,0008	**<0,0001**	0,0991	**<0,0001**	0,0072	0,0020	**0,0005**
CRP (mg/L) [b]	0,0145	0,0574				0,0318	**0,0048**	-0,2226	0,0400	**<0,0001**
Insuline (µU/mL) [b]	0,0056	0,2410				0,0033	0,3678			
ALAT (UI/L) [b]	0,1016	**<0,0001**	0,1112	0,0322	**0,0007**	0,1448	**<0,0001**	0,5079	0,0820	**<0,0001**
ASAT (UI/L) [b]	0,0188	**0,0304**				0,0012	0,5883			
Homocystéine (µmol/L) [b]	0,0138	0,0646				0,0139	0,0629			
Folates (nmol/L) [b]	0,0025	0,4349				0,0121	0,0833			
Vitamine B12 (pmol/L) [b]	0,0133	0,0696				0,0224	**0,0182**			

[a] carré du coefficient de corrélation, [b] valeur transformée en log10, ALAT transaminase TGP, ASAT transaminase TGO.

Il ressort de ce tableau que l'analyse multivariée montre une association entre le cholestérol total et la pression artérielle diastolique et aux marqueurs de l'inflammation (CRP et acide urique).

Tableau 14.f. Déterminants de HDL-cholestérol et du LDL-cholestérol en analyse uni et multivariée chez les hommes.

	HDL-cholestérol					LDL-cholestérol				
	univariée		multivariée			univariée		multivariée		
	R^2 [a]	p	Coefficient de régression	Erreur standard	p	R^2 [a]	p	Coefficient de régression	Erreur standard	p
Age (ans)	0,0036	0,3434				0,0348	**0,0031**			
Tour de taille (cm)	0,0157	**0,0483**	-0,0018	0,0006	**0,0031**	0,0943	**<0,0001**	0,0016	0,0571	**0,0102**
PAS (mm Hg)	0,0030	0,3875				0,0060	0,2234			
PAD (mm Hg)	0,0072	0,1810				0,0003	0,8029			
Acide urique (mg/L)	0,0002	0,8348				0,1038	**<0,0001**			
CRP (mg/L) [b]	0,0812	**<0,0001**				0,0145	0,0580			
Insuline (µU/mL) [b]	0,0221	**0,0189**	-0,0528	0,0226	**0,0205**	0,0117	0,0886	0,0466	0,0231	**0,0448**
ALAT (UI/L) [b]	0,0006	0,6895	-0,1068	0,0228	**0,0001**	0,1786	**<0,0001**	0,1051	0,0280	**0,0002**
ASAT (UI/L) [b]	0,0000	0,9145	0,0822	0,0344	**0,0175**	0,0002	0,8213	-0,0990	0,0349	**0,0049**
Homocystéine (µmol/L) [b]	0,0000	0,9267				0,0161	**0,0457**			
Folates (nmol/L) [b]	0,0185	**0,0320**				0,0050	0,2666			
Vitamine B12 (pmol/L) [b]	0,0078	0,1638				0,0175	**0,0370**			

[a] carré du coefficient de corrélation, [b] valeur transformée en log10, ALAT transaminase TGP, ASAT transaminase TGO.

L'analyse uni et multivariée montre que l'insuline est est associée à HDL et à LDL en multivariée seulement.

5.5. Les déterminants génétiques de l'homocystéine ont-ils une influence sur les déterminants clinico-biologiques du SM ?

A côté de l'association déjà largement décrite dans la littérature de *MTHFR* et *MTRR* avec l'homocystéine, on observe de manière plus originale une association de *MTHFR* avec l'indice de masse corporelle (IMC) (r^2=0,0117, p=0,0188), l'insuline (r^2=0,0132, p=0,0115), les triglycérides (r^2=0,0097, p=0,0379) et le HDL-cholestérol (r^2=0,0103, p=0,0316). Par ailleurs, il existe une association tout à fait surprenante entre la taille et deux polymorphismes liés au métabolisme de la vitamine B12, *MTR 2756A>G* (r^2=0,0157, p=0,0050) et *TCN 776C>G* (r^2=0,0561, p=0,0008) chez les femmes. Cette association observée avec la taille est à comparer avec les données très récentes de la littérature sur le statut en vitamine B12 et le métabolisme du tissu osseux. Il est possible que la vitamine B12 ait un lien avec la croissance, dans la période périnatale et dans la prime enfance et ce point mériterait d'être étudié ultérieurement.

Comme attendu, en fonction des résultats de la 4ème étape, il n'était pas étonnant d'observer l'absence d'association des déterminants génétiques avec les déterminants du syndrome métabolique chez les hommes. Par contre, l'absence d'association de MTR et TCN avec la taille suggère que l'association observée chez les femmes correspond à une influence épigénétique en lien avec le bimorphisme, observation qui a déjà été faite pour un certain nombre d'autres marqueurs (Tableaux 15.a et 15.b).

Tableau 15.a. Déterminants génétiques des variables biologiques et cliniques chez les femmes (n = 678).

	MTHFR 677C>T		*MTHFR 1298A>C*		*MTR 2756A>G*		*MTRR66A>G*		*TCN 776C>G*	
Variable	R^2	p	R^2	p	R^2	p	R^2	p	R^2	p
Poids (Kg)	0,0090	**0,0479**								
Taille (m)					0,0157	**0,0050**			0,0561	**0,0008**
IMC (Kg/m²)	0,0117	**0,0188**								
PAS (mm Hg)										
Créatinine (mg/L)					0,0143	**0,0489**				
Calcium (mg/L)			0,0159	**0,0347**						
Insuline (µU/mL)	0,0132	**0,0115**								
Cholestérol total (g/L)										
Triglycérides (g/L)	0,0097	**0,0379**								
HDL-cholestérol (g/L)	0,0103	**0,0316**	0,0152	**0,0059**						
LDL-cholestérol (g/L)										
ASAT (UI/L)	0,0121	**0,0166**	0,0183	**0,0021**						
Homocystéine (µmol/L)	0,0326	**<0,0001**					0,0170	**0,0032**		
Vitamine B12 (pmol/L)			0,0105	**0,0293**						
Insuline (µU/mL)[a]	0,0119	**0,0013**								
Homocystéine (µmol/L)[a]	0,0182	**0,0021**					0,0104	**0,0303**		
ALAT (UI/L)[a]			0,0086	**0,0550**						

[a] valeurs transformées en log10, IMC indice de masse corporelle, PAS pression artérielle systolique, ALAT transaminase TGP, ASAT transaminase TGO.
On note sur ce tableau une association de la taille avec les polymorphismes *MTR 2756 A>G* et *TCN 776C>G* et que *MTHFR 677C>T* est à l'IMC, à l'insuline, à HDL, aux triglycérides et à l'Hcy.

Tableau 15. b. Déterminants génétiques des variables cliniques et biologiques chez les hommes (n = 249).

	MTHFR 677C>T		*MTHFR 1298A>C*		*MTR 2756A>G*		*MTRR66A>G*		*TCN 776C>G*	
Variable	R^2	p	R^2	p	R^2	p	R^2	p	R^2	p
Poids (Kg)			0,0369	**0,0104**						
Tour de taille (cm)			0,0365	**0,0111**						
IMC (Kg/m²)			0,0398	**0,0073**						
PAS (mm Hg)							0,0358	**0,0129**		
Cholestérol total (g/L)					0,0274	**0,0340**			0,0255	**0,0436**
Triglycérides (g/L)										
LDL_cholestérol (g/L)					0,0306	**0,0228**			0,0310	**0,0222**
Homocystéine (µmol/L)	0,1469	**<0,0001**					0,0290	**0,0296**		
Folates (nmol/L)									0,1192	**<0,0001**
Vitamine B12 (pmol/L)										
Homocystéine (µmol/L)[a]	0,1346	**<0,0001**					0,0309	**0,0236**		
ALAT (UI/L)[a]					0,0268	**0,0366**				

[a] valeurs transformées en log 10, IMC indice de masse corporelle, PAS pression artérielle systolique, ALAT transaminase TGP.
Chez les hommes, le cholestérol total et le LDL sont associés aux polymorphismes *MTR 2756A>G* et *TCN776C>G* alors que le poids, le tour de taille et l'IMC sont plutôt associés à *MTHFR 1298A>C* et l'homocystéine *à MTHFR 677C>T*.

Nous avons, dans une dernière et sixième étape, évalué les déterminants de l'homocystéine, avec la vitamine B9 et la vitamine B12, ainsi qu'avec les déterminants cliniques et biologiques du syndrome métabolique retenus par l'IDF, après ajustement avec l'âge. Il ressort de cette évaluation une association attendue avec la pression artérielle, une association forte avec les folates, la vitamine B12 et *MTHFR* respectivement folates (r^2 = 0,0584, p<0,0001), vitamine B12 (r^2= 0,0272, p<0,0001), *MTHFR 677 C>T* (r^2= 0,0151, p=0,0015). Il n'y a cependant pas d'association avec les autres polymorphismes chez les femmes (Tableau 16. a).

Chez les hommes les mêmes associations ont été observées, mais modestes pour la pression et la vitamine B12 (r^2=0,0335, p=0,0046); par contre, il existe une faible association avec le polymorhpisme *MTRR 66A>G* (r^2=0,0220, p=0,0217) (Tableau 16. b).

Tableau 16.a. Déterminants de la concentration plasmatique d'homocystéine en analyse uni et multivariée, chez les femmes

	Analyse simple		Analyse multiple		
	$R^{2\,a}$	p	Coefficient	Erreur	p
Age (ans)	0,0760	**<0,0001**	0,0029	0,0005	**<0,0001**
IMC (kg/m^2)	0,0093	**0,0123**	-	-	-
Tour de taille (cm)	0,0273	**<0,0001**	-	-	-
PAS (mm Hg)	0,0375	**<0,0001**	-	-	-
PAD (mm Hg)	0,0304	**<0,0001**	-	-	-
Apolipoprotéine A1 (g/L)	0,0000	0,9648	-	-	-
Apolipoprotéine B (g/L)	0,0195	**0,0003**	-	-	-
Cholestérol total (g/L)	0,0056	**0,0530**	-	-	-
HDL-cholestérol (g/L)	0,0118	**0,0048**	-	-	-
LDL-cholestérol (g/L)	0,0129	**0,0032**	-	-	-
Acide urique (mg/L)	0,0589	**<0,0001**	0,0029	0,0006	**<0,0001**
CRP (mg/L)[b]	0,0151	**0,0014**	-	-	-
Glucose (g/L)	0,0064	**0,0387**	-	-	-
Triglycérides (g/L)[b]	0,0204	**0,0002**	-	-	-
Fer (mg/L)[b]	0,0009	0,4361	-	-	-
Insuline (µU/mL)[b]	0,0004	0,5983	-	-	-
ALAT (UI/L)[b]	0,0001	0,7802	-	-	-
ASAT (UI/L)[b]	0,0224	**0,0001**	0,1513	0,0419	**0,0003**
Folates (nmol/L)[b]	0,0584	**<0,0001**	-0,1504	0,0221	**<0,0001**
Vitamine B12 (pmol/L)[b]	0,0272	**<0,0001**	-0,1084	0,0288	**0,0002**
MTHFR 667C>T[c]	0,0151	**0,0015**	0,1152	0,0290	**<0,0001**
MTHFR 1298 A>C[c]	0,0002	0,7056	-	-	-
MTR 2756A>G[c]	0,0016	0,2983	-	-	-
MTRR 66 A>G[c]	0,0038	0,1088	0,0376	0,0183	**0,0404**
Interaction folates**MTHFR 667C>T*	0,0045	0,0837	-	-	-

[a] carré du coefficient de corrélation, [b] valeur transformée en log10, [c] fréquence allélique de l'allèle rare, IMC indice de masse corporelle, PAS pression artérielle systolique, PAD pression artérielle diastolique, ALAT transaminase TGP, ASAT transaminase TGO.

L' homocystéine est fortement corrélée avec les détermnants du SM, les folates et vitamine B12 et avec le polymorphisme *MTHFR 677 C>T*. Il n'a pas d'association avec l'insuline.

Tableau 16.b. Déterminants de la concentration plasmatique d'homocystéine en analyse uni et multivariée, chez les hommes

	Corrélations simples		Régression multiple		
	R^2 [a]	p	Coefficient	Erreur	p
Age (ans)	0,0037	0,3520	-	-	-
IMC (kg/m^2)	0,0039	0,3371	-	-	-
Tour de taille (cm)	0,0020	0,4964	-	-	-
PAS (mm Hg)	0,0327	**0,0050**	-	-	-
PAD (mm Hg)	0,0204	**0,0271**	-	-	-
Apolipoprotéine A1 (g/L)	0,0021	0,4791	-	-	-
Apolipoprotéine B (g/L)	0,0125	0,0850	-	-	-
Cholestérol total (g/L)	0,0088	0,1489	-	-	-
HDL-cholestérol (g/L)	0,0003	0,8065	-	-	-
LDL-cholestérol (g/L)	0,0104	0,1161	-	-	-
Acide urique (mg/L)	0,0099	0,1251	-	-	-
CRP (mg/L) [b]	0,0183	**0,0368**	-	-	-
Glucose (g/L)	0,0024	0,4502	-	-	-
Triglycérides (g/L) [b]	0,0115	0,0985	0,2112	0,0868	**0,0157**
Fer (mg/L) [b]	0,0579	**0,0002**	0,2138	0,0718	**0,0032**
Insuline (µU/mL) [b]	0,0219	**0,0220**	-	-	-
ALAT (UI/L) [b]	0,0018	0,5133	-	-	-
ASAT (UI/L) [b]	0,0048	0,2848	-	-	-
Folates (nmol /L) [b]	0,1191	**<0,0001**	-0,2318	0,0535	**<0,0001**
Vitamine B12 (pmol/L) [b]	0,0335	**0,0046**	-0,1297	0,0551	**0,0194**
MTHFR 667C>T [c]	0,1431	**<0,0001**	0,9126	0,2555	**0,0004**
MTHFR 1298A>C [c]	0,0002	0,8092	-	-	-
MTR 2756A>G [c]	0,0012	0,5961	-	-	-
MTRR 66 A>G [c]	0,0220	**0,0217**	-	-	-
Interaction folates**MTHFR 667C>T*	0,0938	**<0,0001**	-0,7882	0,3485	**0,0247**

[a] carré du coefficient de corrélation, [b] valeur transformée en log10, [c] fréquence allélique de l'allèle rare, IMC indice de masse corporelle, PAS pression artérielle systolique, PAD pression artérielle diastolique, ALAT transaminase TGP, ASAT transaminase TGO.

Ce tableau montre que chez les hommes que l'homocystéine est modestement associée à la pression artérielle à la CRP ; mais très associée aux folates, à la vitmine B12, aux polymorphismes *MTHFR 677C>T* et *MTRR 66A>G*.

DISCUSSION

Très peu de travaux dans la littérature ont évalué les relations entre les déterminants nutritionnels et génétiques de l'homocystéine et les marqueurs lipidiques, dans un contexte d'obésité associée ou non au syndrome. La plupart des études ont porté uniquement sur l'association entre l'homocystéine et cholestérol et/ou triglycérides (Yamamoto et al.,1999; Smith et al., 2006). Il a été ainsi rapporté dans de nombreuses études une association entre homocystéine et cholestérol. Certaines études rapportent une association avec les triglycérides. L'association de l'homocystéine avec la CRP est également bien établie (Semiz et al., 2008). Une étude a montré l'influence de *MTHFR 677T* sur l'index de masse corporelle, les critères anthropométriques reflétant une répartition des adipocytess anormales, chez les adolescent hypertendus, dans une étude réalisée en Corée (Koo et al., 2008).

Très récemment des données expérimentales sur des souris génétiquement modifiés ont montré une influence complexe du métabolisme de l'homocystéine sur ApoA1 et HDL. Le groupe de Rozen a montré chez les souris *MTHFR +/-* une diminution des mRNAs ApoA1 et ApoA4 et une augmentation des mRNAs de *CYP7A1*. Parallèlement, une augmentation de l'expression de l'ApoA1 dans le foie a été retrouvée par immunoempreinte et ainsi qu'une augmentation de la concentration plasmatique (Mikael et al., 2006).

Un travail sur cellules HepG2 a montré que l'homocystéine diminue PPARα ce qui suggère un mécanisme régulateur sur le promoteur d'ApoA. Ces résultats ont été confirmés par une association significative bien que modeste de la concentration en homocystéine plasmatique avec celle de l'ApoA1 et de HDL cholestérol, évaluée dans 60 plasmas de patients ayant une maladie coronaire (Mikael et al., 2006).

Un deuxième mécanisme peut être évoqué concernant une modification des HDL et de l'ApoA1 pouvant affecter la clairance de ces lipoparticules. Ainsi Liao et coll., 2007 ont observé une diminution de la concentration en HDL chez des souris ayant une double invalidation pour les gènes *CBS* et *ApoE*. Ceux-ci s'accompagnaient d'une diminution plus

importante sur la fraction des HDL de grandes tailles. Parallèlement les auteurs n'ont pas retrouvé de modifications du niveau de mRNA dans le foie bien que ApoA1 soit diminué, dans l'analyse par immunoempreinte. Les auteurs ont également observé une diminution de l'activité de la LCAT et une augmentation de la clairance de HDL corrélée avec une augmentation du récepteur scavenger B1. Au total leurs résultats montrent que l'association entre homocystéine, HDL et ApoA1 résultent de mécanismes complexes qui impliquent non seulement la synthèse hépatique mais également la taille et la clairance des lipoparticules. Il faut également ajouter que chez les souris invalidées pour le gène *ApoE*, un régime carencé en folates et supplémenté en fer (effet pro-oxydant) provoque une hyperhomocystéinémie influencée par le génotype avec un effet plus important sur les souris sauvages que chez les souris porteuses de l'allèle ε4 ou homozygotes pour l'invalidation du gène.

Nos résultats apportent la première confirmation sur une population de grande taille des données expérimentales qui mettent en évidence l'association entre homocystéine et HDL et ApoA1. Plusieurs éléments permettent de montrer que les déterminants nutritionnels jouent un rôle important dans cette association. Nous avons ainsi montré que la vitamine B12 et avec la CRP est le déterminant le plus significativement associée à la concentration en ApoA1 et que cet effet est lié au sexe puisqu'il est retrouvé principalement chez les femmes (Tableau 14.a). Ce résultat est à prendre en considération dans le contexte des caractéristiques particulières de la population de l'Afrique de l'Ouest. Il existe une prévalence de l'obésité plus importante chez les femmes que chez les hommes et la fréquence du syndrome métabolique est également plus importante chez les femmes. Ces dernières données contrastent avec celles observées en Europe. La vitamine B12 est également logiquement associée avec le cholestérol total ainsi qu'avec la concentration en HDL. Les analyses multivariées ne retrouvent pas d'association avec les folates lorsque la vitamine B12 est incluse dans le modèle. Ces deux déterminants ont un rôle complémentaire dans la reméthylation de l'homocystéine en

méthionine. La vitamine B12 est le cofacteur de la méthionine synthase et les folates sont le co-substrat de donneurs de méthyles dans cette réaction. La vitamine B12 peut donc avoir une influence plus limitante, notamment dans des conditions de stress oxydant augmenté comme suggéré dans le modèle expérimental des souris ApoE (Rogers et al., 2007) qui montre l'effet d'un régime pro-oxydant sur l'hyperhomocystéinémie chez les souris invalidées pour le gène. Les déterminants génétiques ont également une influence, quoique modeste, sur la concentration d'HDL cholestérol chez les femmes, tandis que cette association n'est pas retrouvée chez les hommes. Au total, notre étude montre donc une association entre la vitamine B12, HDL et ApoA1 chez les femmes. Il est peu probable qu'un déficit en vitamine B12 à lui seul explique cette association, dans une population dont les apports nutritionnels sont bons. Notre travail sera donc complété par une évaluation sur les relations entre le statut cellulaire en vitamine B12 et le stress oxydant, dans le contexte du syndrome métabolique, dans la mesure où ce co-facteur de la méthionine synthase doit être en permanence réduit par la méthionine synthase réductase. Nous avons récemment déjà observé une influence du stress oxydant sur l'hyperhomocystéinémie, en fonction du polymorphisme de la méthionine synthase réductase chez des patients atteints d'une maladie de Crohn.

PERSPECTIVES

- L’association ApoA/ApoB est probablement en lien avec les troubles de la reméthylation au niveau hépatique, nécessité de compléter le travail de manière plus fine avec SAM et SAH, ainsi qu’avec l’acide méthylmalonique.
- L’association HDL-chol, ApoB et LDL-chol mériterait d’être étudiée par rapport à la clairance des lipoparticules, il faudrait notamment inclure la créatinine et la clairance calculée (formule de Levey). Il faudrait regarder cette association dans le sous-ensemble marché Dantokpa où nous disposons de la créatinine. L’association avec la

taille chez les femmes est une observation intéressante pour laquelle il faudrait également disposer des autres marqueurs du métabolisme de la B12 dont SAM, SAH, acide méthylmalonique, mais aussi des nouveaux déterminants génétiques, *GAL3* et *FUT*.

CONCLUSION GENERALE

Les résultats que nous avons obtenus concernent trois aspects, le statut nutrigénétique associé au métabolisme des monocarbones en Afrique de l'Ouest, en fonction du lieu géographique et de l'environnement, les influences gènes-environnement comparées avec d'autres zones géographiques, notamment Europe, Mexique et Chine, et les associations avec trois pathologies prévalentes en Afrique de l'Ouest, l'hépatite virale, le paludisme et le syndrome métabolique lié à l'obésité.

Concernant le premier aspect, le principal mérite de notre travail a été de montrer qu'il existe une traduction phénotypique très importante du polymorphisme *MTHFR 677TT* sur l'homocystéinémie, qui est probablement en rapport avec une prévalence importante de carence en folates, mais qui suggère également l'existence d'un autre mécanisme, peut être génétique, non encore identifié. En effet, il existe clairement un sous-groupe de sujets *MTHFR TT* ayant une hyperhomocystéinémie modérée à majeure, malgré l'absence de carence en folates et d'influence d'autres marqueurs métaboliques connus. Par comparaison, le polymorphisme de la transcobalamine n'a pas d'incidence sur l'homocystéinémie.

Le deuxième aspect nous a permis de montrer que le statut en folates exerce probablement une pression de sélection sur la fréquence allélique de *MTHFR 677 T*, en comparant la situation africaine à celle d'autres continents. Pour compléter cette analyse, il conviendrait de réaliser des études plus approfondies, notamment en disposant de données sur l'association avec le risque d'avortements spontanés. Il reste par rapport à cette hypothèse un point à éclaircir qui est la relative absence d'influence de la migration des populations d'Afrique de l'Ouest en Amérique du Nord sur la fréquence de l'allèle *T*. Il est cependant possible que la levée de la pression de sélection ne permette pas d'observer une évolution de la fréquence sur la durée envisagée qui se situe entre deux et quatre siècles. Par contre, nos résultats sur la comparaison des populations migrantes et autochtones pour le polymorphisme *TCN 776 C>G* nous ont permis d'évoquer l'appréciation de sélection liée à la prévalence du paludisme. Cette

hypothèse a été confirmée dans une étude complémentaire où nous avons évalué l'association de ce polymorphisme avec la gravité de la maladie chez les enfants. Les mécanismes qui sous-tendent cette association sont probablement en lien avec le métabolisme mitochondrial de la vitamine B12. Parallèlement, cette étude nous a également permis de montrer une association paradoxale entre la réplétion en folates et la gravité de la maladie. Là aussi, les hypothèses mécanistiques doivent être précisées, mais pourraient reposer sur le besoin important d'un point de vue métabolique du paludisme en dérivés co-enzymatiques des folates.

Enfin, le troisième aspect de notre thèse a permis également de montrer une association favorable de l'allèle *T* de *MTHFR* avec l'hépatite virale. Il ouvre également des perspectives quant à l'association entre vitamine B12, folates et homocystéine et la concentration plasmatique en HDL et ApoA, dans le syndrome métabolique. Ces associations peuvent, peut-être, représenter un lien mécanistique dans l'association largement décrite dans la littérature entre l'hyperhomocystéinémie et le risque vasculaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acakpo A, Fayomi B, Djrolo F. Prévalence et étude des facteurs déterminants de l'obésité à Cotonou. Med Afr Noire 2000; 47(119): 5276-81.

Adjalla CE, Amouzou EK, Sanni A, Abdelmouttaleb I, Chabi NW, Namour F, Guéant JL. Low frequency of Mutated Methylenetetrahydrofolate Reductase 677 C→T and 1298 A→C genetics Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Sub-Saharan populations Clin Chem Lab Med 2003; 41:1028-32.

Afmann LA, Lievers KJ, van der Put NM, Trijbels FJ, Blom HJ. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defect Eur J Hum Genet 2002; 10:433–8.

Ahn SH, Park JY, Lee CK, Lee CK, Kang SW, Chon CY. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea Hepatology 2000; 31:1371–1373.

Akar N, Akar E, Akcay R. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677 C>T, 1298 A>C, and 1317 T>C on factor V 1691 mutation in Turkish deep vein thrombosis patients Thromb Res 2000; 97:163-7.

Almarri A, Batchelor JR. HLA and hepatitis B infection. Lancet 1994;344:1194–1195.

Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Guéant RM, Feillet F, Sanni A, Guéant JL. High prevalence of hyperhomocyteinemia related to folate deficiency and the 677 C→T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. Am J Clin Nutr 2004; 79: 619-24.

Annales de Biologie Clinique du Québec, 2005;42(2):31-32.

Andersson A, Brattström LE, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. Eur J Clin Invest 1992; 22: 79-87.

Aris P, Malaria. Nature Biotechnology 2000; 18: 111-12.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Kumada M, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Shimomura I, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. Circulation 2002; 105: 2893–98.

Ayoola EA. Viral hepatitis in Africa. In: Zuckerman AJ, editor. Viral hepatitis and liver diseases New York: Liss; 1988;161–169.

Bailey LB, Gregory JF 3rd. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr*. 1999; 129(5):919-22.

Bellia C, Bivona G, Scazzone C, Ciaccio M. Association between homocysteinemia and metabolic syndrome in patients with cardiovascular disease. Ther Clin Risk Manag 2007;3(6):999-01.

Beutler B, Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator Annu Rev Biochem 1988; 57: 505-18.

Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD and Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics Circulation 1995; 91: 2488-96.

Bloomgarden ZT**.** Definitions of the insulin resistance syndrome.The 1st world congress on the insulin resistance syndrome Diabetes Care 2004; 27: 824-30.

Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:3290–3295.

Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Guéant JL. Methionine synthase (MTR) 2756 (A-G) polymorphism, double

heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are 3 risk factors for having a child with Down syndrome. Am. J. Med. Genet 2003; 121: 219-24.

Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes Kidney Int 1997; 52: 10-20.

Botto LD, Yang Q. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am JEpidemiol 2000; 151(9):862– 77.

Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L**.** Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis *Circulation.* 1998 Dec 8; 98(23):2520-6.
Bray GA, Tartaglia LA. Medical strategies in the treatment of obesity Nature 2000; 404:672-7.

Bréchot C, Hadchouel M, Scotto J, Fonck M, Potet F, Vyas GN. State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and -negative liver diseases Proc Natl Acad Sci USA 1981;78:3906–3910.

de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ. Biological cardiovascular risk factors and plasma homocysteine levels in the general Dutch population Atherosclerosis 2001;154: 513-4.

de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20–65 y.Am J Clin Nutr 2001;73:1027–33.

de Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease Pharmacol Rev 2002; 54: 599-618.

Brilakis ES, Berger PB, Ballman KV, et al. Methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C>T and methionine synthase reductase (MTRR) 66 A>G polymorphisms: association

with serum homocysteine and angiographic coronary artery disease in the era of flour products fortified with folic acid. Atherosclerosis 2003; 168: 315-22.

Brown CA, McKinney KQ, Kaufman JS, et al. A common polymorphism in methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease. J Cardiovas Risk 2000; 7: 197-200.

Boduroglu K, Alanay Y, Koldan B, Tuncbilek E. Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. Am J Med Genet A 2004;127:5–10.

Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am J Epidemiol 2000;151:862–877.

Bowen RA, Wong BY, Cole DE. Population-based differences in frequency of the transcobalamin II Pro259Arg polymorphism Clin Biochem 2004;37:128–33.

Buysschaert M : Actualités dans le domaine de l'insulinothérapie ou les nouvelles insulines en 2004. *Louvain Med*. 2004 ; 123 : S158-62.

Cardon LR, Palmer LJ**.** Population stratification and spurious allelic association Lancet 2003; 361(9357):598-604.

Carlos TM, Harlam JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules Blood 1994; 84: 2068-2101.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 3666.

Cavantes EI, Mutchinick OM. Defectos de cierre del tubo neural y nutricion materna: estudio multicéntrico en una muestra de la poblacion mexicana (Neural tube defects and maternal nutrition Multicentric study in a Mexican population.) Doctoral dissertation National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico 1999 (in Spanish).

Chadefaux-Vekemans B, Coude M, Muller F, Oury J, Cali A, Kamoun P. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in the etiology of Down syndrome Pediatr Res 2002;51:766 –7.

Chemaly SM, Chen CT, van Zyl R L. Naturally occurring cobalamins have antimalarial activity. Journal Inorganic Biochemistry 2007; 101: 764–73.

Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase: cDNA cloning, gene localization, and expression J Biol Chem 1997; 272: 3628-34.

Chen P, Poddar R, Tipa EV, Dibello PM, Moravec CD, Robinson K, Green R, Kruger WD, Garrow TA, Jacobsen DW. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease Adv Enzyme Regul 1999; 39: 93-109.

Chiang, P. K. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase Pharmacol. Ther 1998; 77:115–34.

Chillemi R, Zappacosta B, Simpore J, Persichilli S, Musumeci M, Musumeci S. Hyperhomocysteinemia in acute Plasmodium falciparum malaria: an effect of host–parasite interaction. Clinica Chimica Acta 2004; 348: 113–20.

Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, Gilfix BM, Rosenblatt DS, Gravel RA, Forbes P, Rozen R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. Am J Med Genet 1999; 84:151-7.

Clark IA, Hunt NH, Cowden WB, Maxwell LE, Mackie EJ Radical mediated damage to parasites and erythrocytes in *Plasmodium vinckei* infected mice after injection of t-butyl hydroperoxide. Clin Exp Immunol 1984; 56(3):524–30.

Clarke S. Protein isoprenylation and methylation at the carboxyl-terminal cysteine residues Annu Rev Biochem 1992; 61: 355.

Conri C, Constans J, Parrot F, Skopinski S, Cipriano C. Homocystéinémie : rôle en pathologie vasculaire 2000; 13: 737–41.

Coursaget P, Yvonnet B, Chotard J, Vincelot P, Sarr M, Diouf C. Age- and sex-related study of hepatitis B virus chronic carrier state in infants from an endemic area (Senegal). J Med Virol 1987;22:1–5.

Cranford LS. Diagnosis, prevention and intervention for the metabolic syndrome Am J Cardiol 2003; 92:35–42.

Deurenberg-Yap M, Chew SK, Deurenberg P. Elevated body fqt percentage and cardiovascular risks at low body mass index levels among Singaporean Chinese, Malays and Indians. Obesity Rev 2002;3:209-15.

Deurenberg P, Deurenberg-Yap M, Guricci S. Asians are different from Caucasians and from each other in their body mass index/body fat per cent relationship. Obesity Rev 2002;3:141-6;

Dhur A, Galan P, Hercberg S. Folate status and the immune system Prog Food Nutr Sci 1991;15:43–60.

Dianov GL, Timchenko TV, Sinitsina OI, Kuzminov AV, Medvedev OA, Salganik RI. Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in doublestrand break and deletion formation. Mol Gen Genet 1991;225:448–452.

Dockrell HM, Playfair JHL. Killing of *Plasmodium yoelii* by enzyme induced products of the oxidative burst. Infect Immun 1984; 43(2): 451–6.

Doolin MT, Barbaux S, McDonnell M, Hoess K, Whitehead AS, Mitchell LE. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. Am. J. Hum. Genet. 2002; 71: 1222-6.

Egan TJ, Combrinck JM, Egan J, Hearne GR, Marques HM, Ntenteni S, Sewell BT, Smith PJ, Taylor D, van Schalkwyk DA, Walden JC. Fate of haem iron in the malaria parasite Plasmodium falciparum. Biochem J 2002; 365: 343–7.

Egan TJ, Haemozoin (malaria pigment): a unique crystalline drug target. Targets 2003;2 :115–4.

Erel O, Kocyigit A, Avci S, Aktepe N, Bulut V. Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. Clin Biochem 1997; 30(8):631–9.

Esfahani ST, Cogger EA, Caudill MA. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups J Am Diet Assoc 2003; 103(2): 200– 7.

Etoundi Ngoa LS. Obésité en milieu hôtelier : influence du poste de travail sur les métabolismes lipidiques et glucidiques, et sur la pression artérielle de 180 employées des hôtels de Yaoundé au Cameroun. Med Afr Noire 2006 ; 53(3): 138-40.

Etoundi Ngoa LS, Longo F, Melaman Sego F. Obésité, hypertension artérielle et diabète dans une population de femmes rurales de l'Ouest du Cameroun. Med Afr Noire 2001; 48(10): 391-3.

Fasshauer M, Paschke R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. Diabetologia 2003; 46:1594-603.

Fiers W. Tumor necrosis factor: Characterization at the molecular, cellular and in vivo level FEBS Lett. 1991;285: 199.

Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; 287: 356-9.

de Franchis R, Sebastio G, Andria G, Mastroiacovo P. Spina bifida, 677TT mutation, and role of folate Lancet 1995; 346:1703 (letter).

Francis SE, Sullivan DJ, Goldberg DLE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* Annu Rev Microbiol 1997;51: 97–123.

Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:5606–5611.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nature Genet 1995;10: 111-3.

Finco TS, Baldwin AS Mechanistic aspects of NF-kB regulation: the emerging role of phsophorylation and proteolysis Immunity 1995; 3:263-2.

Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. J Nephrol 2000; 13: 20–33.

Fried SK, Russell CD, Grauso NL, Brolin RE.Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. J Clin Invest 1993; 92:2191–8.

Fuster V. Mechanisms leading to myocardial infarction: insight from studies of vascular biology Circulation 1994; 90: 2126-46.

Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. Gene 2000; 257: 279-89.

Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yamell JW, Evans A, Whitehead AS. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. Atherosclerosis 2001; 157: 451-6.

Geisel J, Zimbelmann I, Schorr H, Knapp JP, Bodis M, Hubner U, Herrmann W. Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemia. Clin Chem Lab Med 2001; 39: 698-704.

Gentilini M., 1990. Le paludisme dans Médecine Tropicale. Paris, Flammarion, 91-122.

Gilmore J. « Body mass index and health », Health Reports, vol. 11, no 1, 1999; 31-43.

Ginsburg H, Stein WD. How many functional transport pathways does? Trends Parasitol 2005; 21:118-21.

Guéant JL, Namour F. Vitamin B12: Apsorption, mtabolism and deficency. Encyclopedia of Gastroenterology 2003; 619-24.

Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, Ferri R, Romano A, Candito M, Namour B. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? Clin Chem Lab Med. 2003; 41(11):1473-7.

Guéant JL, Candito M, Andres E, Van Obberghen E, Nicolas JP. Familial pernicious anaemia with hyperhomocysteinaemia in recurrent early pregnancy loss Thromb Haemost 2004; 92:1147–9.

Guéant-Rodriguez RM, Rendeli C, Namour B, Venuti L, Romano A, Anello G, Bosco P, Debard R, Gérard P, Viola M, Salvaggio E, Guéant JL. Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans Neurosci Lett 2003; 344(3):189-92.

Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Debard R, Thirion S, Xiao Hong L, Bronowicki JP, Namour F, Chabi NW, Sanni A, Anello G, Bosco P, Romano C, Amouzou E, Heidy R, Arrieta B, Sànchez BE, Romano A, Herbeth B, Guilland JC, Mutchinick OM. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study among Mexican, West African and West European populations. Am J Clin Nutr 2006; 83:701–7.

Gueant JL, Chabi NW, Gueant-Rodriguez RM, Mutchinick O, Debard R, Payet C, Xiaohong L, Villaume C, Bronowicki JP, Quadros EV, Sanni A, Amouzou E, Xia B, Chen M, Anello G, Bosco P, Romano C, Arrieta HR, Sànchez BE, Romano A, Herbeth B, Anwar W, Namour F.

Environmental influence on the worldwide prevalence of a 776C > G variant in the transcobalamin gene (TCN2). J Med Genet 2007; 44:363–367.

Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection Science 1999;284:825–829.

Guilland JC, Lequeu B. Les vitamines: Du nutriment au médicament. EM internationales. Paris. 1992. p 357.

Gulati S, Baker P, Li YN, Fowler B, Kruger W, Brody LC, Banerjee R. Defects in human methionine synthase in cblG patients. Hum Molec Genet 1996; 5: 1859-65.

Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) Mammalian Genome 1998; 9: 652-6.

Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Gu¨nther S. Serological pattern ‘‘anti-HBc alone: report on a workshop. J Med Virol 2000;62:450–455.

Gross RL, Reid JVO, Newberne PM, Burgess B, Marston R, Hift W. Depressed cell-mediated immunity in megaloblastic anemia due to folic acid deficiency. Am J Clin Nutr 1975;28:225–232.

Hakami N, Neiman PE, Canellos GP, Lazeron J. Neonatal megaloblastic anemia due to inherited transcobalamin II deficiency in two siblings N Engl J Med 1971; 285: 1163-70.

Harris RB. Leptin, much more than a satiety signal. Annu Rev Nutr 2000; 20: 45-75.

Hassold TJ, Burrage LC, Chan ER, Judis LM, Schwartz S, James SJ, Jacobs PA, Thomas NS Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. Am J Hum Genet 2001; 69(2):434-9.

Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. Am J Hum Genet. 2000;67(3):623-30.

Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran Jr LJ, Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern DM, Schmidt AM. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. J Clin Invest 2001; 107: 675-83.

Höhler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U. HLA-DRB1*1301 and *1302 protect against chronic hepatitis. J Hepatol 1997;26:503–507.

Humbert P, Nguyen N. Physiopathologie de l'acanthosis nigricans. Ann Dermatol Vénéréol, 1998, *125* : 851-5.

Institut canadien d'information sur la santé. Améliorer la santé des Canadiens, Ottawa, Institut canadien d'information sur la santé, 2004).

Isolato PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. Am J Hum Genet 2000; 67:986 –90.

Jacobsen DW, Gatautus VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Ji J, Otto JM, Taylor Jr LM. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects Clin Chem 1994; 40: 873–81.

Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations Circulation 1996; 93: 7-9.

Jacques PF, Bostom AG, Selhub J, Rich S, Ellison RC, Eckfeldt JH, Gravel RA, Rozen R; National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI family heart study. Atherosclerosis 2002; 166: 49-55.

Jaffiol C, Rouard M, Macari F. Résistance à l'insuline : du diagnostic clinique à la génétique moléculaire. Bull Acad Natl Méd, 1999, 183: 1761-75.

James SJ, Pogribna M, Pogribny IP. Abnormal folate metabolism and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene may be maternal risk factors for Down syndrome. Am J Clin Nutr 1999;70: 495–501.

Jahner D, Stuhlmann H, Steward CL, Harbers K, Lo¨hler J, Simon I. De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. Nature 1982;298:623–628.

Jayshree RS, Ganguly NK, Sheti A, Mahajan RC. Oxidative metabolic response of peripheral blood monocytes of monkeys during primary and chronic *Plasmodium knowlesi* infection APMIS 1992; 99(1):245–7.

Jullien D. Pathogenesis of the metabolic syndrome. Annales de Dermatologie 2008; 135 : supplément 4, S243-8.

Kadowaki T, Yamauchi T, Adiponectin and adiponectin receptors Endocrinol Rev 2005; 26: 439–51.

Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. J Exp Med 2000;192:921–930.

Kluijtmans LA, Young IS, Boreham CA, et al. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. Blood 2003; 101: 2483–8.

Koo HS, Lee HS, Hong YM. Methylenetetrahydrofolate reductase TT genotype as a predictor of cardiovascular risk in hypertensive adolescents. Pediatr Cardiol 2008;29(1):136-41.

Kumar KS, Govindaiah V, Naushad SE, Devi RR, Jyothy A. Plasma homocysteine levels correlated to interactions between folate status and methylene tetrahydrofolate reductase gene mutation in women with unexplained recurrent pregnancy loss. J Obstet Gynaecol 2003;23:55– 8.

Kushi LH, Lenart EB, Willett WC: Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge. 1. Plant foods and dairy products. Am J Clin Nutr 1995; 61(suppl):1407S–15S.

Lee WM. Hepatitis B virus infection N Engl J Med 1997;24:1733–1745.

Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R, Gravel RA. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. Hum Molec Genet 1996; 5: 1867-74.

Legros F, Danis M, Noireau E. Caractéristiques épidémiologiques du paludisme d'importation en France métropolitaine (CNRMI : données 1999- 2000). Bull Centre National de Référence des maladies d'Importation, 2002, 16-17.

Levander OA, Ager AL. Malarial parasites and antioxidant nutrients Parasitology 1993; 107: 95–106.

Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Weller B, Steiner G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apo B production in normal weight and obese individuals Diabetes 1993; 42: 833–42.

Liao Y, Hutto A, Kwon S et al. Critical evaluation of adult treatment Panel III criteria in identifying insulin resistance with dyslipidemia. Diabetes Care 2004 ; 27 : 978-83.

Liao D, Yang X, Wang H. Hyperhomocysteinemia and high-density lipoprotein metabolism in cardiovascular disease Clin Chem Lab Med 2007; 45:1652–9.

Lissak A, Sharon A, Fruchter O, Kassel A, Sanderovitz J, Abramovici H. Polymorphism for mutation of cytosine to thymine at location 677 in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with recurrent early fetal loss. Am J Obstet Gynecol 1999;181:126 –30.

Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. Hum Molec Genet 1996; 5: 1851-8.

Li YP, Schartz RJ, Waddel ID, Holloway BR, Reid MB. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. FASEB J 1998; 12: 871-80.

Loetscher, Pan YCE, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. Cell 1990; 61: 351.

Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop Gastroenterology 2001; 120:1828–1853.

Lombard L, Augustyn MN, Ascott-Evans BH. The metabolic syndrome: pathogenesis, clinical features and management Cardiovasc J S Afr 2002;13(4):181-6.

Malmström R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Jarvinen H. Effects of insulin and acipimox on VLDL1 and VLDL2 apolipoprotein B production in normal subjects. Diabetes 1998; 47:779–87.

Malvy D., Djossou F., Thiebaut R., Le Bras M. Plasmodies-Malaria. Formes cliniques et diagnostic dans Encyclopédie médico-chirurgicale. Paris, Elsevier 2000 ; 8: 507-20.

Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 1996; 27: 517-27.

Mc Caddon A, Blennow K, Hudson P, Regland B, Hill D. Transcobalamin polymorphism and homocysteine. Blood 2001; 98:3497–9.

Mc Cully KS, Wilson RB. Homocysteine theory of arteriosclerosis Atherosclerosis 1975;22: 15-27.

Mc Quillan BM, Beilby JP, Nidorf M, Thompson PL, Hung J. Hyperhomocysteinemia but not the C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase is an independent risk determinant of carotid wall thickening The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS) Circulation 1999; 99: 2383-8.

Medina M, Amores-sanchez MI. Genetic basis of hyperhomocysteinemia. Mol Genet Metab 2000; 71: 478–80.

Mikael LG, Genest J Jr, Rozen R. Elevated Homocysteine Reduces Apolipoprotein A-I Expression in Hyperhomocysteinemic Mice and in Males with Coronary Artery Disease Circ Res. 2006; 98:564-571.

Miller JW, Ramos MI, Garrod MG, Flynn MA, Green R. Transcobalamin II 775 G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. Blood 2002; 100: 718-20.

Miner SE, Evrovski J, Cole DE Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update Clin Biochem 1997; 30:189–201.

Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW.Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ Int J Obes Relat Metab Disord 1998; 22:1145–58.

Mohan K, Ganguly NK, Dubey ML, Mahajan RC. Oxidative damage of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*: An in vitro study. Ann Hematology 1992;65(3):131–4.

Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD, O'Rahilly S. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes, Diabetes 1998; (47) :1384–91.

Morrow DA, Ridker PM. C-reactive protein, inflammation, and coronary risk Med Clin North Am 2000; 84(1):149–61.

Munoz-Moran E, Dieguez-Lucena JL, Fernandez-Arcas N, Peran-Mesa S, Reyes-Engel A. Genetic selection and folic acid intake during pregnancy. Lancet 1998;352:1120 –1.

Mutabingwa T, Nzila A, Mberu E et al. Chlorproguanil-dapsone for treatment of drug-resistant falciparum malaria in Tanzania Lancet 2001; 358: 1218–23.

Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. In Vivo 1999; 13(3):295-309.

Nakanishi M, Iwata A, Yatome C, Kitade Y. Purification and properties of recombinant Plasmodium falciparum S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. J Biochem (Tokyo) 2001; 129(1):101–5.

Namour F, Guy M, Aimone-Gastin I, de Nonancourt M, Mrabet N, Gueant JL Isoelectrofocusing phenotype and relative concentration of transcobalamin II isoprotein related to the codon 259 Arg/Pro polymorphism Biochem Biophys Res Commun 1998;251:769–74.

Namour F, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Gueant JL. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. Blood 2001; 97: 1092-8.

N'Diaye MF, Obésité en Afrique : définitions et épidémiologie, J Afr Hepato Gastroenterol 2007 ; 1 : 71-5.

Nelen WL, Steegers EA, Eskes TK, Blom HJ. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss Lancet 1997;350: 861 (letter).

Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH. Association of the Metabolic Syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutritional Examination Survey Circulation, 2004; 109:42–6.

Nobutada T, Masayuki N, Yoshio K, Katsura S, Saori Y, Yasutomo I, Yukio K and Kazuo T N. Crystal Structure of S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase from the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* J. Mol. Biol. 2004; 343:1007–1017.

Nzila A, Ward SA, Marsh K, Sims P, Hyde JE. Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part I): pointers for malaria treatment from cancer chemotherapy. Trends Parasitol 2005;21:292–8.

Nzila A, Ward SA, Marsh K, Sims P, Hyde JE. 2005. Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part II): activities as yet untargeted or specific to Plasmodium. Trends Parasitol 2005;21:334–9.

Nzila A.The past, present and future of antifolates in the treatment of *Plasmodium falciparum* infection J Antimic Chemother 2006;57:1043–54.

O'Leary VB, Parle-McDermott AP, Molloy AM. MTRR and MTHFR polymorphisms: link to Down syndrome? Am J Med Genet 2002; 107:151–55.

Olliaro PL, Goldberg DE. The Plasmodium digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target. Parasitology today 1995;11(8):294-7.

OMS, Atlas of heart disease and stroke, Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2004.

OMS, Obésité : prévention et prise en charge de l'épidémie globale : rapport d'une consultation de l'OMS ; Genève Séries de rapports techniques 894, 2003.

Ouchi N, Kihara S, AritaY, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin, Circulation 1999 ; 100 : 2473–6.

Pallaud C, Stranieri C, Sass C, Siest G, Pignatti F, Visvikis S. Candidate gene polymorphisms in cardiovascular disease: a comparative study of frequencies between French and Italian populations. Clin Chem Lab Med 2001; 39(2):146– 54.

Papapetrou C, Lynch SA, Burn J, Edwards YH. Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects Lancet 1996; 348:58 (letter).

Pascot A, Lemieux I, Prud'homme D. Reduced HDL particle size as an additional feature of the atherogenic dyslipidemia of abdominal obesity. J Lipid Res 2001; 42: 2007-14.

Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M, Rickards O, De Stefano GF, Prisco D, Gensini GF, Abbate R. Heterogeneity in word distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase. Am J Hum Genet 1998;63:917–20.

Philippe-Bourgeois Annales de Biologie Clinique 1997; 55 (6): 619-22.

Poddar R, Sivasubramanian N, Dibello PM, Robinson K and Jacobsen D. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. Circulation 2001; 103: 2717-23.

Poulliot MC, Despres J, Lemieux S. Waist circumference and abdominal saggital diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women Am J Cardiol 1994; 73:460-8.

Postma NS, Mommers EC, Eling WM, Zuidema J. Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy. Pharm World Sci 1996; 18 (4):121–9.

van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida Lancet 1995; 346: 1070 –1.

Quinlivan EP, McPartlin J, McNulty H, et al. Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease Lancet 2002; 359:227– 8.

Rajkovic A, Mahomed K, Rozen R, Malinow MR, King IB, Williams MA. Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C>T polymorphism, plasma folate, vitamin B12 concentrations and risk of preeclampsia among black African women from Zimbabwe Mol Genet Metab 2000;69:33–39.

Ratter F, Gabner C, Shatrov V, Lehmann V. Modulation of tumor necrosis factor-a- mediated cytotoxicity by changes of cellular methylation state: mechanism and in vivo relevance Int Immunol 1999; 11: 519-27.

Retief FP, Gottlieb CW and Herbert V. Mechanism of vitamin B, uptake by erythrocytes J Clin Invest 1966; 45: 1907-1915.

Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women JAMA 1998; 280: 1843-8.

Rinaldi A. Fighting malaria at the crossroads, EMBO reports, 2004; 5: 847-851.

Robertson KD, Ambinder RF. Methylation of the Epstein-Barr virus genome in normal lymphocytes Blood 1997;90:4480–4484.

Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, van Lente F, Gupta A, Kottke-Marchant K, Savon SR, Selhub J, Nissen SE, Kutner M, Topol EJ, Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease Circulation 1995; 92: 2825-30.

Rogers EJ, Chen S, Chan A. Folate deficiency and plasma homocysteine during increased oxidative stress. N Engl J Med. 2007 Jul 26; 357(4):421-2.

Rosenblatt DS. Folate and homocysteine metabolism and gene polymorphisms in the etiology of Down syndrome Am J Clin Nutr 1999;70:429–30.

Rosenblatt DS, Fenton W. Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease New York: McGraw-Hill, 2001; 3897–933.

Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, et al. The frequent 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. Am J Hum Genet 2002; 70:758–62.

Rosenthal PJ, Meshnik SR, in: I.W. Sherman (Ed.), Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection, ASM Press, Washington, DC, 1998; 145–158.

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340: 115-26.

Roth J, Goebeler, Ludwing S, Wagner L, Kilian K, Sorg C, Harms E, Shulze-Osthoff, Koch HG. Homocysteine inhibits tumor necrosis factor-induced activation of endothelium via modulation of nuclear factor-kb activity. Biocimica Biophysica Acta 2001; 1540: 154-65.

Sadewa AH, Sutomo R, Hayashi C, Lee MJ, Ayaki H. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Indonesian Javanese population Kobe J Med Sci 2002; 48(5–6):137– 44.

Sandoval DA, Davis SN. Leptin: metabolic control and regulation. J Diabetes Complications 2003;17:108-113.

Santé Canada. Lignes directrices pour la classification du poids chez les adultes (Catalogue H49-179), Ottawa, Santé Canada, 2003).

Schachter M. Lien entre le taux d'homocystéine et le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). Hum Reprod 2003;18: 721-7.

Schultz-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation J Biol Chem 1992; 267:5317.

Scott JM, Weir DG. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry J Cardiovasc Risk 1998; 5: 223–7.

Seetharam B. Receptor- mediated endocytosis of cobalamin (vitamin *B* 12). Ann Rev Nutr 1999*;* 19: 173-95.

Selhub J, Jaques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population JAMA 1993;270: 2693–8.

Semiz S, Rota S, Özdemir O, Ozdemir A, Kaptanoglu B. Are C-reactive protein and homocysteine cardiovascular risk factors in obese children and adolescents? Pediat Int 2008.50:419-23.

Senok AC, Nelson EA, Li K, Oppenheimer SJ. Thalassaemia trait, red blood cell age and oxidant stress: effects on *Plasmodium falciparum* growth and sensitivity to artemisinin. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997;91(5):585–9.

Shaw GM, Rosen R, Finnel RH, Wasserman CR, Lammer EJ. Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase and risk for spina bifida Am J Epidemiol 1998;148: 30–7.

Shields DC, Kirke PN, Mills JL, et al. The “thermolabile” variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: an evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. Am J Hum Genet 1999; 64:1045–55.

Shuldiner AR, Yang R, Gong D-W. Resistin, obesity, and insulin resistance: the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. N Engl J Med 2001; 345:1345-6.

Sibley CH, Hyde JE, Sims PF et al. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? Trends Parasitol 2001; 17: 582–8.

Simpore J, Pignatelli S, Barlati S, Malaguarnera M, Musumeci S. Plasma homocysteine concentrations in a healthy population living in Burkina Faso. Curr Ther Res 2000; 61(9):659–68.

Smith J, Al-Amri M, Sniderman A, Cianflone K. Leptin and adiponectin in relation to body fat percentage, waist to hip ratio and the apoB/apoAI ratio in Asian Indian and Caucasian men and women. Nut Metab 2006;3:18.

Snow R. W., Guerra C. A., Noor A. M., Myint H. Y., Hay S. I., 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria, Nature 434: 214-7.

Sow AM, Ndiaye MF, Fassa H Aspects cliniques et biologiques de l’obésité au Sénégal, à propos de 318 cas. Med Afr Noire 1986 ; 33(3): 243-50.

Stegmann K, Ziegler A, Ngo ET, Kohlschmidt N, Schroter B, Ermert A, Koch MC. Linkage disequilibrium ofMTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD). Am J Med Genet 1999; 87:23–9.

Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR. C677T mutation in the 5,10- MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy Eur J Hum Genet 2002;10:388 –90.

Suffys P, Beyaert R, van Roy F and Fiers W. Reduced tumor necrosis factor induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism. Biochem Biophys Res Commun 1987; 149: 735.

Sumner AE. The relationship of body fat to metabolic disease: influence of sex and ethnicity. Gend Med 2008;5(4):361-71.

Swanson DA, Pangilinan F, Mills JL, Kirke PN, Conley M, Weiler A, Frey T, Parle-McDermott A, O'Leary VB, Seltzer RR, Moynihan KA, Molloy AM, Burke H, Scott JM, Brody LC. Evaluation of transcobalamin II polymorphisms as neural tube defect risk factors in an Irish population Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2005;73:239–44.

Taskinen MR, Kahri J, Koivisto V, Shepherd J, Packard CJ.Metabolism of HDL apolipoprotein A-I and A-II in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus Diabetologia 1992;35: 347–56.

Tekwani, B. L, Walker L. A... Targeting the hemozoin synthesis pathway Comb Chem. High Throughput Screen 2005; 8: 63–79.

Terruzzi I, Senesi P, Fermo I, Lattuada G, Luzi L. Are genetic variants of the methyl group metabolism enzymes risk factors predisposing to obesity? J Endocrinol Invest 2007; 30(9):747-53.

Thio CL, Carrington M, Marti D, O'Brien SJ, Vlahov D, Nelson KE. Class II HLA alleles and hepatitis B virus persistence in African Americans J Infect Dis 1999;179:1004–06.

Thurnham DI, Singkamani R.The acute phase response and vitamin: A status in malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 1991;85:194–9.

Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CEM, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AVS. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia N Engl J Med 1995;332:1065–69.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. Br J Nutr 2004; 92:347–55.

Turrini A, Saba A, Perrone D, Cialfa E, D'Amicis A. Food consumption patterns in Italy: the INN-CA Study 1994–1996 Eur J Clin Nutr 2001; 55:571– 88.

Ubbink JB, Christianson A, Bester MJ, et al. Folate status, homocysteine metabolism, and methylene tetrahydrofolate reductase genotype in rural South African blacks with a history of pregnancy complicated by neural tube defects. Metabolism 1999;48:269 –74.

Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease and drug therapy. J Lab Clin Med 1989; 144: 450–73.

Ueland PM, Refsum H, Brattström L. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: Francis Jr RB Ed. Atherosclerotic cardiovascular disease. Marcel Dekker, Inc. hemostasis, and endothelial function New York, 1992; 183-236.

Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. Clin Chem 1993;39: 1764-79.

Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism.Trends Pharmacol Sci 2001; 22: 195–201.

Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W and Vandenabeele P. Inhibition of caspases increase the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. J. Exp. Med 1998; 187: 1477.

Virtanen JK, Voutilainen S, Alfthan G. Homocysteine as a risk factor for CVD mortality in men with other CVD risk factors: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factors (KIHD) Study. J Intl Med 2005; 257:255–6.

Walliker, D., Quakyi, I.A., Wellems, T.E., McCutchan, T.F., Szarfman, A., London,W.T., Corcoran, L.M., Burkot, T.R., Carter, R. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Science 1987; 236, 1661–1666.

Wang G and OK. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) in human monocytes: possible involvement of oxygen free radicals. Biochem J 2001; 357: 233-40.

Wang G, Siow YL and OK. Homocysteine induces monocyte chemoattractant protein-1 expression by activating NF-kappa B in THP-1 macrophages Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 280: H2840-7.

Wang SJ, Lengeler C, Smith TA, Vounatsou P, Akogbeto M, Tanner M. Rapid Urban Malaria Appraisal (RUMA) IV: epidemiology of urban malaria in Cotonou (Benin) Malaria 2006;5:45–54.

Warhurst DC. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria N Engl J Med. 2001; *344:299-302*.

Webber J. Energy balance in obesity. Proc Nutr Soc 2003; 62:539–43.

Wellems TE. Plasmodium chloroquine resistance and the search for a replacement antimalarial drug Science 2002*;* 298:124-6

Whaun, J. M., Miura, G. A., Brown, N. D., Gordon, R. K. Chiang, P. K. Antimalaria activity of neplanocin Awith perturbations in the metabolism of purines, polyamines and S-adenosylmethionine J Pharmacol Expt Ther 1986; 236:277–83.

Whitehead AS, Gallagher P, Mills JL, A genetic defect in 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects QJM 1995; 88:763– 6.

Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, López MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martínez-Frías ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. J Med Genet 2003;40(8):619-25.

Wilson A, Leclerc D, Saberi F, Campeau E, Hwang HY, Shane B, Phillips JA, Rosenblatt DS, Gravel RA. Functionally null mutations in patients with the cblG-variant form of methionine synthase deficiency. Am J Hum Genet 1998; 63(2):409-14.

Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. Mol Genet Metab 1999; 67(4):317-23.

World Health Organization, Department of Non-Communicable Disease Surveillance (1999) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. World Health Organization, Geneva

Yamamoto A, Horibe H, Mabuchi H, Kita T, Matsuzawa Y, Saito Y, Nakaya N, Fujioka T, Tenba H, Kawaguchi A, Nakamura H, Goto Y. Analysis of serum lipid levels in Japanese men and women according to body mass index. Increase in risk of atherosclerosis in postmenopausal women. Atherosclerosis 1999;143(1):55-73.

Yamanishi M, Vlasie *M*, Banerjee R. Adenosyltransferase: an enzyme and an escort for coenzyme B12? Trends Biochem Sci. 2005;30:304-8.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMPactivated protein kinase. Nat Med 2002; (8): 1288–95.

Yvan-Charvet L, Even P, Bloch-Faure M. Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes 2005; 54: 991-9.

Yoffe B, Burns DK, Bhatt HS, Combes B. Extrahepatic hepatitis B virus DNA sequences in patients with acute hepatitis B infection. Hepatology 1990;12:187–192.

Zhang Y, Zhang M, Niu T, Xu X, Zhu G, Huo Y, Chen C, Wang X, Xing H, Peng S, Huang A, Hong X, Xu X. D919G polymorphism of methionine synthase gene is associated with blood pressure response to benazepril in Chinese hypertensive patients. J Hum Genet 2004; 49: 296-301.

Zetterberg H, Regland B, Palmér M, et al. The transcobalamin codon 259 polymorphism influences the risk of human spontaneous abortion. Hum Reprod 2002;17:3033–6.

Zetterberg H, Zafiropoulos A, Spandidos DA, Rymo L, Blennow K. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C.T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. Hum Reprod 2003;18:1948–50.

Zetterberg H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. Reprod Biol Endocrinol 2004; 2: 7.

Zhou J, Moller J , Ritskes-Hoitinga M, Larsen MI, Austin RC, Falk E. Effect of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. Atherosclerosis 2003; 168:255-62.

Zhou SS, Tang LH, Sheng HF, Wang Y. Malaria situation in the People’s Republic of China. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 2004;24:1–3.

Zieske AW, Malcom GT, Strong JP. Natural history and risk factors of atherosclerosis in children and youth: the PDAY study. Pediatr Pathol Mol Med 2002; 21: 213-7.

Zou CG, Banerjee R. Tumor necrosis factor-alpha-induced targeted proteolysis of cystathionine beta-synthase modulates redox homeostasis. J Biol Chem 2003; 278: 16802-8.